

GIOVANI PISA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DE SOLO
CULTIVADO DE CAMPO BELO DO SUL (SC) CAPAZES DE
NODULAR FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação
em Ciências – Bioquímica, do Setor de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientador: Profº Leonardo Magalhães
Cruz**

**CURITIBA
2006**

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	8
1.2	TAXONOMIA E DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS	9
1.3	ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS ENTRE BACTÉRIAS E SEUS HOSPEDEIROS...	10
1.4	MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE TAXONOMIA.....	12
1.4.1	HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA.....	13
1.4.2	ESTUDOS DE HOMOLOGIA DE rRNA	13
1.4.3	MÉTODOS MOLECULARES DE TIPAGEM BASEADOS EM DNA	14
1.5	RNAS RIBOSSOMAIS.....	17
1.5.1	A IDÉIA DE RELÓGIO EVOLUCIONÁRIO	18
1.5.2	rRNAs COMO CRONÔMETROS MOLECULARES	19
1.6	MÉTODOS TAXONÔMICOS NA ERA GENÔMICA	19
1.7	TAXONOMIA E FILOGENIA DE BACTÉRIAS PRESENTES EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS	21
1.7.1	ESPÉCIES DE <i>Rhizobium</i> E <i>Allorhizobium</i> , QUE FORMAM UM GRUPO MONOFILÉTICO (SAWADA et al, 2003)	21
1.7.2	BETA-RIZÓBIOS QUE NODULAM LEGUMINOSAS (CHEN et al, 2001)	22
1.8	MANEJO DO SOLO E DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS	24
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO NÓDULO	27
3.2	ESTOCAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	29
3.3	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQÜENCIAMENTO DO 16S rDNA	29
3.4	AMPLIFICAÇÃO DO 16S rDNA.....	32
3.5	PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO PARA SEQÜENCIAMENTO	33
3.6	REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO	33
3.7	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	34
3.7.1	MONTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CONTÍGUAS.....	34
3.7.2	PESQUISA POR SIMILARIDADE	38
3.7.3	ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA	39
4	RESULTADOS	42
4.1	AMPLIFICAÇÃO DO 16S rDNA	42
4.2	SEQÜENCIAMENTO DO 16S rDNA	46
4.3	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS	48
4.3.1	MONTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CONTÍGUAS.....	48
4.3.2	MONTAGEM DA SEQÜÊNCIA PARA A ESTIRPE 199.....	56
4.3.3	IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEJOEIRO POR ANÁLISE DE SIMILARIDADE DAS SEQÜÊNCIAS DE 16S rDNA.....	59
4.3.3.1	HIERARQUIA TAXONÔMICA: RESULTADO DA ANÁLISE DO RIBOSSOMAL DATABASE PROJECT (RDP II)	59

4.3.3.2 BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST	65
4.3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	81
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÕES	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE	104
APÊNDICE A – Formato de arquivo Fasta.	104
APÊNDICE B – Sequências contíguas.	104
APÊNDICE C – Arquivo .phd gerado pelo programa PHRED.	112

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO DO 16S rDNA.	30
QUADRO 2: PROGRAMAS UTILIZADOS NA MONTAGEM E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS CONTÍGUAS DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO	37
QUADRO 3: COMBINAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DO 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO	44
QUADRO 4: TOTAL DE SEQÜÊNCIAS OBTIDAS POR OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO.	47
QUADRO 5: SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO, UTILIZADAS NAS ANÁLISES DE BUSCA POR SIMILARIDADE E FILOGENIA.	50
QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST. TODOS OS ALINHAMENTOS MOSTRADOS NA TERCEIRA COLUNA POSSUEM IGUAIS VALORES DE EXPECT, IDENTIDADES E GAPS.	67

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO DA REGIÃO DE CAMPO BELO DO SUL – SC EM ÁREAS CULTIVADAS SOB REGIME DE PLANTIO DIRETO (PD), PLANTIO CONVENCIONAL (PC) E CAMPO NATIVO (CN).....	28
TABELA 2: MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DE 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO....	52
TABELA 3: RESUMO DOS LIMITES DE CONFIANÇA ATINGIDOS PELAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S, COM BASE NO GENE DE <i>E. COLI</i> (HTTP://WWW.PSB.UGENT.BE/RRNA/PRIMERS/BS.HTML).....	31
FIGURA 2: AUTOMATIZAÇÃO DOS PROGRAMAS PARA MONTAGEM E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rDNA DE ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEJOEIRO.	40
FIGURA 3: CHAMADA DE BASES DO PROGRAMA PHRED.	41
FIGURA 4: PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEJOEIRO COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.	45
FIGURA 5: ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA DAS REGIÕES CONTÍGUAS OBTIDAS.....	57
PARA O ISOLADO DE NÓDULO DE FEJOEIRO 199 COM A SEQUÊNCIA <i>RHIZOBIUM TROPICI</i>	57
FIGURA 6: ÁRVORE MOSTRANDO A RELAÇÃO FILOGENÉTICA DA ESTIRPE 130 COM ESPÉCIES PRÓXIMAS DE <i>MICROBACTERIUM</i>	83
FIGURA 7: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>PSEUDOMONAS</i> E <i>SPHINGOMONAS</i>	84
FIGURA 8: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS.....	85
FIGURA 9: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE <i>RALSTONIA</i> E <i>BURKHOLDERIA</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA: RNA ribossomal de 16S

16S rDNA: gene do RNA ribossomal de 16S

23S rDNA: gene do RNA ribossomal de 23S

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucléico)

G+C: Soma de bases G e C

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos Amplificados).

ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

ERIC: *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

GBDP: *Genome BLAST Distance Phylogeny*

HTML: *Hypertext Markup Language*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado).

RDP II: *Ribosomal Database Project II* (rdp.cme.msu.Edu)

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A maioria organismos necessitam de uma fonte de nitrogênio numa forma mais reduzida do que aquela presente na atmosfera, para que desta maneira este elemento possa ser assimilado, inicialmente pelas plantas. A exceção são os organismos fixadores de nitrogênio. Estes organismos reduzem o gás dinitrogênio (N_2) presente na atmosfera até formas que possam ser assimiladas por outros organismos. Somente alguns procariotos têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e torná-lo disponível a todas as formas de vida. A fixação do nitrogênio, parte do ciclo biogeoquímico deste elemento, pode ser realizada por processos industriais (NEWTON, 1996) que contribuem com 25% do total de nitrogênio fixado e por processos físicos como relâmpagos, combustão e vulcanismo, cuja contribuição com o total de nitrogênio fixado é de 10%. Porém a maior contribuição está na fixação biológica de nitrogênio, responsável por um total de 65% do total de nitrogênio fixado anualmente. A diazotrofia, habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia é uma característica exclusiva de *Bacteria* e *Archeabacteria* (SAWADA et al, 2003). A vantagem da fixação biológica sobre a produção industrial de fertilizante torna-se evidente se um parâmetro comparativo como a energia for colocada em questão, pois na produção industrial há um consumo de 2% da energia mundial para a produção de fertilizantes (BRITISH PETROLEUM, 1996). Resultados indicam que a cultura de feijão, em condições não laboratoriais, pode se beneficiar do processo da fixação biológica de nitrogênio alcançando níveis de produtividade de até 2.500 kg/ha (EMBRAPA, 2003). Experimentos com o feijão caupi em Petrolina, Estado de Pernambuco, revelou que esta cultura pode ter um aumento de produtividade de até

85%, passando de 400 kg/ha para potenciais 700 kg/ha, com a inoculação do rizóbio adequado - resistente a altas temperaturas e a deficiência de água (BIOTECNOLOGIA, 2004). Daí a necessidade de se explorar todas as possibilidades da Fixação Biológica de Nitrogênio (NEWTON, 2000).

1.2 TAXONOMIA E DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS

A taxonomia é tida, modernamente, como sinônimo de sistemática e tradicionalmente dividida em três partes, segundo COWAN (1968) e STALEY & KRIEG (1984):

- 1) Classificação: ordenação dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade entre eles.
- 2) Nomenclatura: rotulagem das unidades definidas na classificação.
- 3) Identificação dos organismos desconhecidos: Determinação de quais organismos pertencem às unidades genômicas e ecológicas pré-existentes.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que dividam 70% ou mais de hibridização DNA-DNA. A hibridização deve apresentar menos de 5 °C de ΔT_m , que é a diferença em graus Celsius da temperatura de desnaturação entre o híbrido homólogo e heterólogo formado sob condições padrão (WAYNE et al, 1987). Uma espécie de bactéria é uma categoria que circunscreve um grupo de indivíduos (estirpes/isolados) coerentes genomicamente, que dividam um alto grau de similaridade em muitos aspectos independentes, testados comparativamente sob condições padronizadas (STACKEBRANDT et al, 2002).

Análises de seqüências do gene que codifica para o 16S rRNA (16S rDNA) têm sido usadas para inferir relações filogenéticas entre espécies de rizóbios, sendo este o critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre bactérias: a

homologia entre seqüências de 16S rRNA. Uma vantagem desta abordagem é que seqüências de DNA e produtos gênicos podem ser comparados em um contexto evolucionário (sistemática molecular) (van BERKUN et al, 2000). Uma opinião estabelecida é que a evolução de alguns genes de bactérias processa-se numa taxa constante por mutação e seleção darwiniana e que a história evolutiva do gene de 16S rRNA aproxima-se da história evolutiva do genoma total, tornando-se desta forma, aceitável reconstruir relações evolucionárias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de 16S rRNA (VAN BERKUN et al, 2000). Para avaliar a possibilidade de que genes de 16S rRNA em algumas estirpes de rizóbios pudessem ser produto de transferência lateral de genes e eventos de recombinação VAN BERKUN et al (2000) compararam filogenias de 16S rDNA e 23S rDNA para o mesmo conjunto de estirpes de rizóbios, obtendo topologias de árvores semelhantes. Desta maneira os autores concluem que a transferência lateral não possui impacto na taxonomia bacteriana com relação a genes de rRNA. A homologia de DNA é atualmente a abordagem adotada como consenso para estabelecer limites entre espécies bacterianas (STACKENBRANDT E GOEBEL, 1994).

1.3 ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS ENTRE BACTÉRIAS E SEUS HOSPEDEIROS

Bactérias que formam associações simbióticas com hospedeiros específicos, fixam nitrogênio formando estruturas especializadas nos hospedeiros e/ou nas próprias bactérias, são chamadas diazotróficos simbióticos. Outras bactérias podem fixar nitrogênio livre de associações simbióticas e utilizar este nitrogênio fixado para o próprio crescimento e são chamadas diazotrofos de vida livre (SAWADA, 2003). Algumas bactérias, a exemplo de *Klebsiella*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* podem colonizar a rizosfera, a porção do solo próxima às raízes que encerra maior população de microorganismos que outras porções do solo (CLARK, 1949), a superfície das

raízes (rizoplano), filosfera (folhas das plantas) e espaços intracelulares de plantas, onde essas bactérias realizam uma fixação de nitrogênio associativa à planta (SAWADA, 2003). As bactérias diazotróficas simbióticas do primeiro tipo mencionado, realizam associações simbióticas importantíssimas ao nodularem membros da família Fabaceae (legumes) (SAWADA, 2003), e algumas não-leguminosas (VARGAS & HUNGRIA, 1997). A contribuição dos diazotróficos simbióticos em termos de quantidade e eficiência de N fixado é imensa (SAWADA, 2003). Dada a importância das leguminosas na agricultura, por exemplo, o feijoeiro (*Phaseolus sp*) é considerada a leguminosa mais importante para a nutrição humana, fonte de proteína vegetal e aminoácidos essenciais (VELÁZQUEZ et al, 1988) é consumido por 500 milhões de pessoas na América Latina, Leste e Sul da África (VARGAS & HUNGRIA, 1997). A pesquisa científica tem procurado exaustivamente compreender as características da nodulação de bactérias que formam associações simbióticas com leguminosas para melhorar a eficiência na produção agrícola (EADY, 1991; SPAINK et al, 1998).

Inicialmente a classificação intragênica do gênero *Rhizobium* em nível específico foi efetuada com relação aos tipos de plantas hospedeiras (especificidade por hospedeiro) infectadas por simbioses de leguminosas (JORDAN & ALLEN, 1974). Contudo, como estudos de inoculação usando grandes números de isolados das mais diversas fontes numa gama enorme de leguminosas mostrou um número significativo de exceções, a especificidade por hospedeiro perdeu gradualmente sua confiabilidade como um critério taxonômico. Novas abordagens experimentais, tais como caracteres fenotípicos (caracteres experimentais e bioquímicos) e caracteres genotípicos (conteúdo G+C, similaridade DNA-DNA e similaridade DNA-rRNA) tornaram-se novos critérios taxonômicos e conseqüentemente a classificação de simbioses de leguminosas experimentou as maiores mudanças tanto nos níveis de

gênero como de espécie (JORDAN, 1984). Subseqüentemente, pesquisas sucessivas em taxonomia bacteriana (sistemática) melhoraram a compreensão da filogenia das bactérias simbiotes e marcadores quimiotaxonômicos (e.g. quinonas isoprenóides e ácidos graxos celulares), dados filogenéticos moleculares (seqüências do gene 16S rDNA e seqüências de genes que codificam para proteínas), tornaram-se positivamente usados como critério taxonômico para classificar simbiotes de leguminosas. Conseqüentemente, surgem incompatibilidades entre as classificações fenotípicas anteriores e as filogenéticas atuais (van BERKUN et al, 2000). Deste modo alguns *taxa* estão agora enfrentando necessidades de correções (YOUNG et al, 2001). Somado a isso, análises genômicas de simbiotes de leguminosas completando-se rapidamente estão fornecendo resultados que podem alterar a classificação destes simbiotes no futuro (KANEKO et al, 2000; 2002; FREIBERG et al, 1997).

1.4 MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE TAXONOMIA

Todos os métodos que não são direcionados para as moléculas de DNA ou RNA são chamados métodos fenotípicos, mesmo os que utilizam-se de marcadores quimiotaxonômicos. Os métodos fenotípicos clássicos para tipagem bacteriana incluem a análise de características morfológicas da bactéria (forma da bactéria, flagelos, teste Gram, etc.) e da colônia, fisiológicas e bioquímicas (crescimento em temperaturas variadas, valores de pH, concentração de sal, condições atmosféricas, proteínas, etc) Estas características como um todo podem ser usadas para o reconhecimento de alguns *taxa*. Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são uma conseqüência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atualmente dominam os estudos taxonômicos modernos (VANDAMME et al, 1996). Atualmente um método direcionado para moléculas de proteína têm sido explorado o Proteoma, uma

abordagem que utiliza-se da análise em larga escala das proteínas de determinado organismo. Um conjunto crescente de tecnologias-chave está tornando possível identificar um grande número de proteínas numa mistura ou complexo, mapear suas interações num contexto celular e anlaizar suas atividades biológicas (ZHU, BILGIN e SNYDER, 2003).

1.4.1 HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA

Os valores de hibridização, a porcentagem de ligação DNA-DNA e a razão relativa de ligação são parâmetros indiretos da similaridade de sequência entre dois genomas. A hibridização é uma ferramenta essencial para descrever e confirmar novas espécies (WAYNE et al, 1987). Um nível de reassociação, ou seja, a formação de heterodúplex, entre dois isolados de mais de 70% revela que estes dois isolados pertencem à mesma espécie. Porém há diferentes metodologias utilizadas para medir a formação do heterodúplex e os critérios de avaliação podem variar, tornando difícil a reprodução do experimento. Sendo assim, o valor de 70% deve ser apenas indicativo e não absoluto. Além disso, a metodologia de reassociação DNA-DNA pode tornar-se demasiadamente demorada pois envolve comparações par-a-par (*parwise*) fazendo com que o número de comparações seja menor que o desejável. Mesmo assim, o resultado de formação de heteroduplex é estável e suporta bem as definições de espécies (VANDAMME et al, 1996; YOUNG, 2000).

1.4.2 ESTUDOS DE HOMOLOGIA DE rRNA

Os rRNA são tidos como o melhor alvo para se estudarem relações filogenéticas, pois estão presentes em todas as bactérias, archeabactérias e eucariotos, são funcionalmente constantes e a maior parte da sequência destes rRNA é altamente

conservada (WOESE, 1987; STACKENBRANDT & GOEBEL, 1994), sendo estas as principais características de um cronômetro molecular. Até alguns anos atrás não era possível se determinarem seqüências de rRNA completas. Então, por mais de uma década os rRNAs foram caracterizados em termos de catálogos de oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos curtos, de aproximadamente 20 bases eram produzidos por digestão de 16S rRNA com ribonuclease T1 (que cliva especificamente resíduos G). Uma coleção destes fragmentos de seqüências do rRNA constitui um catálogo de oligonucleotídeo: um padrão característico complexo e detalhado de uma espécie bacteriana (WOESE, 1987). A comparação entre estes catálogos permitia que agrupamentos filogenéticos fossem identificados, incluindo os mais altos (FOX, 1985). O catálogo era suficiente para definir a maior parte dos filos bacterianos, porém falhava em resolver as ordens e subdivisões, entre outras dificuldades. Atualmente esta técnica foi substituída pelo seqüenciamento direto do gene ou partes do gene de 16S e 23S com técnicas de PCR e oligonucleotídeos iniciadores apropriados (VANDAMME et al, 1996).

1.4.3 MÉTODOS MOLECULARES DE TIPAGEM BASEADOS EM DNA

Métodos baseados em tipagem de DNA geralmente referem-se a técnicas que permitem subdividir espécies em tipos distintos. Estas técnicas são universalmente aplicáveis, altamente reprodutíveis e relativamente fáceis de realizar. A análise de fragmentos de restrição de genoma total pode ser feita em gel de agarose e os polimorfismos de comprimentos assim estabelecidos. A desvantagem deste método é que muitos padrões complexos de fragmentos de DNA são gerados e difíceis de comparar. A análise dos polimorfismos de comprimento de DNA plasmidial possui um padrão de bandejamento mais simples (VANDAMME et al, 1996).

Para se diminuir o número de fragmentos pode-se selecionar enzimas com

freqüência menor de corte no DNA, uma técnica que analisa fragmentos de restrição de baixa freqüência. Estes fragmentos gerados são muito grandes para serem separados por eletroforese em gel de agarose convencional, então se emprega a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), sendo esta técnica considerada como a mais discriminatória (GORDILLO et al, 1993). Os padrões gerados depois da digestão com enzimas de restrição podem ser transferidos para uma membrana e hibridizados com uma sonda marcada que permita revelar os fragmentos (GRIMONT & GRIMONT, 1986). Um exemplo é o uso do 16S ou 23S com ou sem a região intergênica marcados com fluorescência e usados como sonda e hibridizados com o DNA do isolado (BINGEN et al, 1994).

Métodos de tipagem por DNA baseados em PCR têm atraído cada vez mais interesse. Fragmentos de elementos repetitivos dispersos pelo genoma das bactérias podem ser usados como oligonucleotídeos iniciadores (VERSALOVIC et al, 1991). A PCR também é usada para amplificar genes de rDNA (com ou sem região intergênica) por oligonucleotídeos iniciadores universais de rDNA. Os polimorfismos entre os diferentes operons de rRNA geram arranjos simples de se analisar (KOSTMAN et al, 1992).

Tipagem por DNA baseado em PCR também pode ser combinada com enzimas de restrição no método chamado de análise de restrição de rDNA amplificado (ARDRA). O gene de 16S ou 23S rDNA com ou sem a região intergênica é amplificado por PCR com oligonucleotídeos iniciadores universais e então digeridos com enzimas de restrição combinadas. Estes padrões em contraste com outros métodos de análise de fragmentos gera padrões espécie-específicos (GÜRTLER et al, 1991) considerando-se o caráter conservado dos genes de rRNA. Um outro exemplo da combinação de PCR e enzimas de restrição é o AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição amplificados) (ZABEAN, 1993). Neste caso a amplificação

seleciona fragmentos de DNA do *pool* de fragmentos de restrição. AFLP separa polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA por amplificação seletiva de fragmentos de restrição. A restrição é feita usando-se duas enzimas que produzem fragmentos de DNA com dois tipos de “pontas”, combinadas aleatoriamente. Para estas pontas, oligonucleotídeos curtos (adaptadores) são ligados para formar *template* para o PCR. A amplificação seletiva é feita usando-se dois oligonucleotídeos iniciadores diferentes, contendo a mesma sequência dos adaptadores, mas estendido para incluir uma ou mais bases seletivas próximo ao sítio de restrição do oligonucleotídeo iniciador. Somente fragmentos complementares à sequência do oligonucleotídeo iniciador são amplificados. O processo de amplificação resulta num arranjo de 30 a 40 fragmentos de DNA, alguns dos quais são grupo-específicos e outros são estirpe-específicos (JANSSENTM). Esta técnica pode ser usada simultaneamente para propósitos de tipagem e processos de identificação.

A molécula da subunidade menor do RNA ribossomal de 16S (16S rRNA) foi estabelecida como marcador universal, e somado a técnicas de sequenciamento de DNA e *softwares* de análise mais acessíveis surgiu uma taxonomia baseada em DNA, sendo impensável publicar a descrição de uma nova espécie sem a sequência de nucleotídeos do gene de 16S rRNA desta espécie para que se estabeleça sua correta posição taxonômica (YOUNG, 2000).

Uma questão atual na taxonomia de procariotos é a seguinte: espécies bacterianas correspondem mesmo a unidades biológicas ou são uma tentativa humana de dividir em partes algo que é contínuo? Mecanismos de coesão genética, que podem em princípio, manter espécies coerentes, envolvem troca gênica suficiente entre membros de uma espécie para manter um *pool* gênico comum entre eles, mas troca gênica extremamente reduzida entre espécies. Mecanismos de coesão ecológica podem manter uma espécie discreta (como unidade biológica) se os membros desta espécie

compartilharem um nicho comum. Estudos de diversidade mostram que algumas bactérias, por exemplo, as entéricas possuem espécies coesivas geneticamente, porém esta característica pode não ser extensível a todos os grupos de bactérias (YOUNG, 2000).

Os genomas bacterianos são compostos, sendo possível dividi-los em duas partes distintas:

- 1) o genoma acessório que possui genes inteiramente “egoístas” ou trazem adaptações em determinadas circunstâncias e são carregados por plasmídeos, ilhas, transposons ou fagos.
- 2) O genoma básico consiste de genes essenciais (*housekeeping*) são carregados nos cromossomos e de organização razoavelmente estável (YOUNG, 2000).

Do genoma básico fazem parte os genes de RNA ribossomais como o 16S, usados em estudos de diversidade exatamente pela característica de estabilidade e de sofrerem pouca influência de transferências horizontais (YOUNG, 2000).

1.5 RNAS RIBOSSOMAIS

Ao contrário de plantas e animais, bactérias possuem morfologias tão simples que não podem ser usadas para definir sua filogenia. A fisiologia bacteriana é mais útil, porém ainda muito limitada (WOESE, 1987). A tecnologia de seqüenciamento de ácidos nucléicos hoje faz da filogenia bacteriana um problema tratável. De fato todas as relações filogenéticas podem agora ser determinadas muito mais facilmente e em muito mais detalhe e profundidade do que jamais foi imaginado (LANE et al, 1985; QU et al, 1983). A informação genotípica, ou seja, a informação contida nas seqüências é superior à informação fenotípica, que é tida como a base

clássica para relacionar e classificar organismos, por duas razões: a informação genotípica é mais pronta, confiável e precisamente interpretada e a informação genotípica é inicialmente mais informativa de relações evolucionárias do que a informação fenotípica (WOESE, 1987). Diferentemente de padrões fenotípicos tridimensionais, um padrão de sequência é unidimensional e pode ser medido de maneira mais simples, em termos de simples relações matemáticas. Os elementos de uma sequência, nucleotídeos ou aminoácidos, são restritos em números e bem definidos (quantificados) substituindo julgamentos subjetivos por julgamentos mais objetivos e relações definidas matematicamente (WOESE, 1987).

1.5.1 A IDÉIA DE RELÓGIO EVOLUCIONÁRIO

O conceito de relógio evolucionário está relacionado com a taxa da mudança genotípica (WOESE, 1987). Os primeiros a tratarem cientificamente de cronômetros moleculares foram ZUCKERKANDL & PAULING (1965), o que veio de encontro ao que os microbiologistas precisavam para resolver os problemas das relações naturais entre bactérias. Em princípio, qualquer molécula que sofre mutações aleatoriamente em determinado tempo pode ser considerada um cronômetro. A quantidade de mudanças que uma sequência acumula (formalmente uma distância) é o produto de uma taxa (na qual as mutações tornam-se fixas) *versus* um tempo (sobre o qual as mudanças ocorreram) (WOESE, 1987).

Um cronômetro molecular deve representar a taxa geral da mudança evolucionária de uma linha de descendentes. As moléculas mais úteis para a medida filogenética representam funções altamente conservadas. As mudanças nestas sequências são lentas o suficiente para cobrir todo o espectro evolucionário.

1.5.2 rRNAs COMO CRONÔMETROS MOLECULARES

As biomoléculas podem ser classificadas em três categorias: semantídeos, epissemantídeos e assemantídeos, de acordo com a informação que elas carregam (ZUCKERKANDL e PAULING, 1965). Os semantídeos são consideradas as moléculas que carregam informação. As moléculas de rRNA são consideradas como semantídeos secundários, sendo o DNA um semantídeo primário e as proteínas semantídeos terciários. Os rRNAs são cronômetros moleculares úteis, mostrando um alto grau de constância funcional, o que assegura um comportamento tipo relógio. Os rRNA ocorrem em todos os organismos em diferentes posições de suas seqüências mudam em taxas bastante diferentes, permitindo a medida da maioria das relações filogenéticas. Os rRNAs são moléculas grandes e consistem de muitos domínios. Há aproximadamente 50 hélices na estrutura secundária do 16S rRNA e aproximadamente o dobro na estrutura secundária do 23S rRNA, fazendo destas moléculas cronômetros precisos. Os rRNAs puderam ser diretamente seqüenciados e rapidamente através da transcriptase reversa (QU et al, 1983; LANE et al, 1985), razão pela qual estas moléculas foram as mais usadas inicialmente como cronômetros moleculares.

1.6 METODOS TAXONÔMICOS NA ERA GENÔMICA

Segundo COENYE et al (2005), os métodos genotípicos clássicos usados na taxonomia bacteriana, como conteúdo G+C, hibridização DNA-DNA e seqüenciamento 16S rDNA, não são significativamente influenciados por forças que moldam o genoma dos procariotos. Entre estas forças estão os rearranjos cromossômicos, aquisição de genes (transferência horizontal de genes) e deleções, que

levam a uma grande diversidade na organização e no conteúdo genômico. Recentemente um número crescente de genomas bacterianos completamente seqüenciados foram publicados.

Alguns autores defendem algumas vantagens de utilizar o conteúdo gênico para avaliar relações filogenéticas. Neste tipo de abordagem é essencial a identificação de genes ortólogos, genes homólogos cuja evolução independente reflete um evento de especiação (FITCH, 1970). Desta maneira é medida a fração de seqüências homologas entre dois genomas (HUYNEN & BORK, 1998).

A conservação da ordem gênica também pode ser usada para inferir relações entre dois organismos. Este tipo de estratégia pode ser utilizada para resolver a filogenia de espécies mais próximas, porém a resolução é baixa para grupos filogeneticamente mais distantes (COENYE et al, 2005). A ordem gênica sofre uma rápida evolução, o que limita o uso desta técnica, sendo apenas complementar aos estudos de seqüência de proteínas e análise de estruturas (WOLF et al, 2001).

Recentemente, técnicas que avaliam a filogenia de um grupo com base nas informações da seqüência do genoma inteiro ou um grande número de seqüências de genes foram desenvolvidas. Também conhecida como filogenômica. HENZ et al (2004), desenvolveram uma abordagem chamada *Genome Blast Distance Phylogeny* (GBDP), que consiste na comparação par-a-par de um genoma contra vários disponíveis em um banco de dados. Uma matriz de distancia é utilizada e estes dados podem, então, ser utilizados na construção de uma árvore filogenética.

As relações entre os *taxa* podem ser comparadas também com base na presença ou ausência de genes que codificam para determinadas famílias de proteínas (HOUSE & FITZ-GIBBON, 2002).

1.7 TAXONOMIA E FILOGENIA DE BACTÉRIAS PRESENTES EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

A taxonomia bacteriana moderna permitiu a construção de uma classificação hierárquica nos níveis taxonômicos mais altos, principalmente com base nos resultados obtidos pela análise filogenética usando seqüências de 16S rDNA. Descrições de novas espécies são determinadas principalmente com base nos resultados de hibridização DNA-DNA, que expõe uma avaliação quantitativa das relações inter e intra-espécies. Além do mais, a questão do quão apropriado é cada *taxon*, é validada incorporando-se vários perfis fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos na estrutura hierárquica baseados em critérios moleculares pelas técnicas citadas acima. Esta série de técnicas é chamada de Taxonomia polifásica (VANDAMME e al, 1996). Nesta abordagem uma árvore filogenética de 16S rDNA é a base para construir a classificação das bactérias e a validação multidimensional é feita examinando-se as várias características moleculares e fenotípicas dos organismos em questão. Esta metodologia é considerada a abordagem padrão na sistemática bacteriana moderna (BOONE et al, 2001; STRACKENBRANDT et al, 2002).

1.7.1 ESPÉCIES DE *Rhizobium* E *Allorhizobium*, QUE FORMAM UM GRUPO MONOFILÉTICO (SAWADA et al, 2003)

Nesta revisão, os autores construíram uma árvore filogenética usando todas as espécies bacterianas conhecidas até aquele momento, contendo simbioses de leguminosas, bem como representantes selecionados de espécies próximas, na tentativa de esclarecer a distribuição dos simbioses de leguminosas. O resultado obtido mostrou que estes simbioses de leguminosas não formam um grupo monofilético, mas estão dispersos em nove grupos separados em diferentes posições

filogenéticas.

As espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Allorhizobium* incluem simbiontes de leguminosas, bem como várias espécies não-simbiontes, como *Agrobacterium* e outras. Os gêneros *Rhizobium* e *Allorhizobium* estão descritos na Classe das alfa Proteobactérias, da ordem Rhizobiales e na família Rhizobiaceae, segundo a edição de 2003 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. O Gênero *Rhizobium* é definido como um grupo de espécies que podem ter tanto flagelos peritríquios ou sub-polares, rápido crescimento, produção de ácido em meio YMA, e incluem estirpes que possuem a habilidade de fixação simbiótica de nitrogênio. Vinte e uma espécies estão atualmente descritas no Gênero *Rhizobium*: *R. Arachi*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. phaseoli*, *R. Sullae*, *R. taenense*, *R. tropici*, *R. undicola* e *R. yanglingense* (KUYKENDALL et al, 2003; SQUARTINI et al, 2002; TAN et al, 2001; WEI et al, 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>). *R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardini*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* podem ainda ser divididos em vários subgrupos e variedades com base na especificidade pelo hospedeiro (SAWADA et al, 2003). O gênero *Allorhizobium* possui uma única espécie: *A. undicola*.

1.7.2 BETA-RIZÓBIOS QUE NODULAM LEGUMINOSAS (CHEN et al, 2001)

A nodulação de leguminosas está bem distribuída na subclasse beta das Proteobactérias, sendo estas bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio chamadas de beta-rizóbios, em oposição às chamadas alfa-rizóbios, pertencentes à sub-classe alfa das proteobactérias (CHEN et al, 2003). Apesar de alguns autores considerarem a presença de bactérias diferentes das alfa-rizóbios nos nódulos de leguminosas como “improvável” (FRED et al, 1932) e utilizarem normalmente o termo “bactérias de

nódulos” como um sinônimo para *Rhizobium* (VINCENT, 1970) há descrições de bactérias diferentes dessas nos nódulos de leguminosas desde 1902 (STURTZ et al, 1997), sendo descrita a espécie *Agrobacterium radiobacter* (BEIJERINCK E VAN DELDEN, 1902) nas raízes de trevo. STURTZ et al, (1997), identificaram nos nódulos das raízes de trevo (*Trifolium pratense* L.) bactérias dos gêneros: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*.

No grupo das alfa Proteobacterias, tradicionalmente foram descritos apenas três ramos capazes fixar nitrogênio simbioticamente (YOUNG e HAUKKA, 1996):

- 1) O ramo que contém os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* e *Allorhizobium*.
- 2) O ramo dos *Azorhizobium*.
- 3) O ramo do gênero *Bradyrhizobium*.

A partir do ano de 2001, outros gêneros começam a ser descritos com a capacidade de estabelecer simbiose com leguminosas. *Methylobacterium*, pertencente a um ramo distinto das alfa Proteobactérias é capaz de nodular *Crotalaria* (SY et al, 2001). RIVAS et al, 2002 descreveram estirpes de *Devosia* capazes de nodular o caule da leguminosa aquática *Neptunia*, cuja espécie bacteriana normalmente em simbiose é *Allorhizobium undicola*. Neste trabalho os genes *nodC* e *nifH*, envolvidos na nodulação e fixação de nitrogênio, respectivamente, foram sequenciados. Representantes do gênero *Ochrobactrum* demonstraram capacidade de nodular leguminosa *Lupinus albus* (TRUJILLO et al, 2005), e os genes *nifH* e *nodC* destas bactérias tiveram suas seqüências reveladas neste trabalho, mostrando grande semelhança com os genes de espécies rizóbios. Há ainda a descrição de bactérias do gênero *Phyllobacterium* que nodulam *Lupinus* (VALVERDE et al, 2005).

Recentemente, houve várias descrições de bactérias pertencentes à subclasse

beta das Proteobactérias que possuem a capacidade de nodular e fixar nitrogênio em associação com leguminosas. Duas bactérias isoladas de *Aspallathus* e *Machaerium* pertenciam ao gênero *Burkholderia*, e havia nestes isolados organização de genes *nodAB* similar aquela encontrada em *Rhizobium* (MOULIN et al, 2001). Espécies pertencentes ao gênero *Ralstonia* (CHEN, 2001) mostraram ser capazes de nodular *Mimosa* sp. VALVERDE et al (2003) descreveram uma nova espécie: *Herbaspirillum lusitanum*, isolada endofiticamente de *Phaseolus vulgaris*. RASOLOMAMPIANINA et al (2005) discutem sobre o fato da diversidade das bactérias que nodulam leguminosas ser bem conhecida em regiões temperadas, mas subestimada nas regiões tropicais. Neste recente artigo estão descritos vários representantes da sub-classe alfa das proteobactérias, bem como alguns isolados dos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*.

1.8 MANEJO DO SOLO E DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS

Os métodos convencionais de preparo do solo têm tido um impacto negativo nos organismos do solo, bem como na construção da estrutura do solo e na sua manutenção. Desta forma, a agricultura intensiva tem ampliado e acelerado o problema da degradação do solo, que é refletida no declínio natural da produtividade e menor utilização destes solos para fins agrícolas (MARTIUS et al., 2001). O uso de práticas conservacionistas, porém, pode resultar em produtividade associada com qualidade e sustentabilidade (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Nos sistemas agrícolas, o sistema de semeadura conhecido com plantio convencional (PC) consiste da semeadura com preparo mecânico do solo, através da aração e da gradagem, enquanto que o sistema de plantio direto (PD) consiste do não revolvimento do solo para a semeadura, apenas com a abertura de um pequeno sulco para entrada da semente, dos fertilizantes e de outros insumos, quando necessários. Em muitos casos, o PD considera a cobertura do solo, adubação verde, terraceamento, e a adubação orgânica.

A transição de um sistema convencional para o sistema de plantio direto tem a capacidade de reduzir significativamente a perda de solo e a perda hídrica (EVERS e AGOSTINI, 2001). O cultivo mínimo é um sistema intermediário, que, também tem sido adotado (BAKER et al., 1996; HUNGRIA et al., 1997).

No PD existe maior biomassa microbiana, caracterizada, principalmente, pelas hifas fúngicas próximas aos resíduos e por bactérias, que podem imobilizar nutrientes temporariamente, evitando perdas (FREY et al., 1999; AON et al., 2001; KLADVIKO, 2001). Na camada abaixo de 15 ou 20 cm, pode haver, por exemplo, um aumento da população microbiana anaeróbica responsável pela desnitrificação e um metabolismo menos eficiente para degradação da matéria orgânica (AON et al., 2001).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A classificação de bactérias é uma necessidade atual para que novas espécies sejam identificadas e que as antigas sejam revistas através de novas e modernas abordagens experimentais de biologia molecular.

Este trabalho justifica-se pela necessidade de identificar e resolver as relações filogenéticas de isolados de feijoeiro (*Phaseolus sp*) de Campo Belo do Sul – SC, sob três tipos de sistemas de manejo: plantio direto, plantio convencional e campo nativo. A simbiose do feijoeiro com rizóbios pode suprir, pelo menos em parte, a necessidade de nitrogênio por parte da planta, sendo seu uso de grande interesse agrícola. A pesquisa com estas bactérias pode fornecer informações valiosas, bem como auxiliar na seleção de estirpes mais eficientes para inoculação das culturas de feijão, obtendo-se desta maneira, o máximo de fornecimento de nitrogênio para a cultura.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

_Amplificar parcialmente o gene do 16S rRNA (16S rDNA) dos isolados de rizóbio utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (oligonucleotídeos iniciadores) específicos.

_Seqüenciar o amplificado do 16S rDNA de todos os isolados, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores intragênicos, e montar os fragmentos seqüenciados em seqüências contíguas.

_Utilizar os dados obtidos com o seqüenciamento em análises que permitam a identificação, classificação e reconstrução filogenética dos isolados. Nesta etapa, as análises foram feitas com o auxílio de programas de computador.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DO NÓDULO

Todas as estirpes analisadas no presente trabalho foram isoladas a partir de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), usado como planta isca, plantado em amostras de solo coletadas em áreas submetidas a diferentes sistemas de plantio (plantio direto, PD; plantio convencional, PC e campo nativo, CN) no município de Campo Belo do Sul – SC. O trabalho inicial de coleta de solo, isolamento e caracterização morfológica, fisiológica e análises de BOX e RFLP foi desenvolvido dissertação de mestrado de Glaciele Kaschuk, na Universidade Estadual de Londrina, em 2003, sob a orientação da Dra. Mariângela Hungria (Embrapa Soja, Londrina - PR). O procedimento usado por KASCHUK (2003) para obtenção dos isolados foi o seguinte: as amostras de solo foram submetidas a diluições seriadas que foram usadas para inocular plantas isca de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em vasos de Leonard, cultivadas em casa de vegetação. Os nódulos foram retirados ao acaso, procedendo-se ao isolamento e obtenção de culturas puras de bactérias (VINCENT, 1970). Para isso, os nódulos foram desinfetados individualmente, durante 1 minuto em álcool (95%), 1 minuto em hipoclorito de sódio (10%) e em água destilada esterilizada, macerados com uma pinça flambada e, com uma alça de platina e repicados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (BERGENSEN, 1961) (manitol, 5,0 g; K₂HPO₄.H₂O, 0,5 g; NaCl, 0,1 g; MgSO₄.H₂O, 0,2 g; extrato de levedura, 1,0 g; ágar, 12 g; vermelho Congo, 2,5 mL (solução estoque de 0,25g / 100 mL⁻¹), dissolvidos em um litro de água destilada, pH 6,8). Os isolados gentilmente cedidos pela Dra Mariângela Hungria estão listados na tabela 1.

TABELA 1: ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO DA REGIÃO DE CAMPO BELO DO SUL – SC EM ÁREAS CULTIVADAS SOB REGIME DE PLANTIO DIRETO (PD), PLANTIO CONVENCIONAL (PC) E CAMPO NATIVO (CN).

Isolado	Fonte	Isolado	Fonte	Isolado	Fonte
87	PD (N/C)	102	PD (N/C)	121	PD
88	PD (N/C)	104	PD (N/C)	122	PD
89	PD (N/C)	105	PD (N/C)	126	PD
90	PD (N/C)	107	PD (N/C)	127	PD
91	PD (N/C)	108	PD (N/C)	130	PD
92	PD (N/C)	109	PD (N/C)	132	PD
94	PD (N/C)	110	PD (N/C)	135	PD
98	PD (N/C)	111	PD (N/C)	139	PD
100	PD (N/C)	114	PD (N/C)	140	PD
101	PD (N/C)	119	PD	149	PD
153	PD	167	PC	194	PC
154	PD	170	PC	195	PC
155	PD	172	PC	199	PC
156	PD	173	PC	200	PC
157	PD	175	PC	204	PC
159	PD	176	PC	205	PC
160	PD	180	PC	206	PC
161	PC	188	PC	213	CN
164	PC	189	PC	218	CN
165	PC	191	PC	226	CN

N/C → não caracterizadas inicialmente pelos métodos utilizados na dissertação de Mestrado de Kaschuk, 2003.

3.2 ESTOCAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Posteriormente às análises morfológicas de análise de colônia realizadas por KASCHUK, 2003, estas bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro passaram a ser chamados de estirpes. As estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro da região de Campo Belo do Sul foram mantidos em meio sólido YMA. Um estoque em glicerol foi feito para cada uma das estirpes: inicialmente as colônias foram coletadas do estoque sólido com auxílio de alça e este material foi inoculado em meio YM líquido por aproximadamente 48 horas sob agitação constante a 120 rpm. A cultura de bactérias foi então centrifugada e ao *pellet* adicionado 500 µL de glicerol 50%, sendo os frascos posteriormente estocados em freezer -20 °C. 30 µL do estoque foi utilizado como inóculo em meio YM durante 48 horas, sob agitação (120 rpm) e a 30 °C. Para a reação de PCR, uma alíquota de 50 uL de cultura foi diluída para um volume final de 500 uL com água milliQ estéril (diluuição de 1:10). As amostras assim preparadas foram usadas para a amplificação do 16S rDNA por PCR.

3.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQÜENCIAMENTO DO 16S RDNA

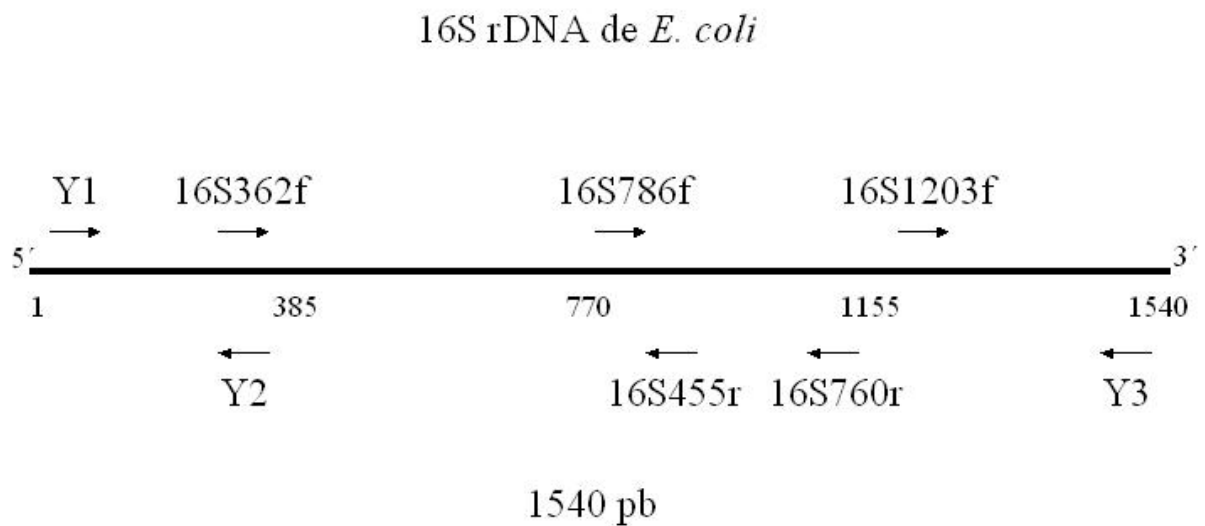
Os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam o gene no sentido direto (fita direta) são Y1, 16S362f, 16S786f, 16S1203f (CRUZ, 2001; YOUNG et al, 1991) e no sentido reverso (fita reversa) são Y3, 16S455r, 16S760r (CRUZ, 2001; YOUNG et al, 1991), e Y2. Na figura 1 é mostrada a localização do anelamento destes oligonucleotídeos iniciadores no gene 16S e no quadro 1, os respectivos parâmetros físicos (CRUZ, 2001).

QUADRO 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S RDNA.

NOME ¹	SEQÜÊNCIA (5' → 3')	COMPRIMENTO	GC%	T _m (°C)	REFERÊNCIA
Direto					
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	24 pb	66,7	80,56	YOUNG, 1991
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	24 pb	70,8	76,62	CRUZ, 2001
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	23 pb	60,9	74,85	CRUZ, 2001
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	25 pb	60	72,49	CRUZ, 2001
Reverso					
Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	24 pb	66,7	74,62	YOUNG, 1991
Y3	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	26 pb	50	67,71	CRUZ, 2001
16S760r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	23 pb	60,9	75,18	CRUZ, 2001
16S455r	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	23 pb	47,8	58,37	CRUZ, 2001

¹ Os nomes foram compostos da seguinte maneira: 16S - derivado do 16S rDNA; números seguintes - posição da última base da ponta 3' na seqüência do 16S rDNA de *E. coli* (BROSIUS et al, 1981); "f" ou "r" - iniciador direto ou reverso, respectivamente.

FIGURA 1: LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 16S, COM BASE NO GENE DE *E. COLI* ([HTTP://WWW.PSB.UGENT.BE/RRNA/PRIMERS/BS.HTML](http://www.psb.ugent.be/rrna/primers/bs.html)).



3.4 AMPLIFICAÇÃO DO 16S RDNA

Na reação de PCR os seguintes reagentes foram utilizados: 5 µL de cultura de bactéria diluída 10 vezes, preparadas como descrito no item 3.2 foram usados como DNA *template*; tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (10 mmol/ L de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol/ L de KCl) diluído 10 vezes de acordo com recomendação do fabricante (Invitrogen); 1,5 mmol/ L de cloreto de magnésio, MgCl₂; 200 µmol/L de dNTP com iguais concentrações dATP, dTTP, dCTP e dGTP; par de oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 0,1 pmol/ µL e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Na amplificação e no sequenciamento do 16S foram utilizadas varias combinações de oligonucleotídeos iniciadores além do par Y1 (YOUNG et al, 1991) e Y3 (Chen et al, 2000) que amplifica quase todo o gene, aproximadamente 1500 pares de bases. Uma região um pouco menor do 16S das estirpes foi amplificada utilizando-se o par 16S362f e Y3, que resulta na amplificação de aproximadamente 1000 pares de bases. O maior número de amplificações, contudo foi obtida com a combinação Y1 e Y2 (YOUNG et al, 1991), cujo fragmento amplificado possui em torno de 300 pares de bases. A solução foi completada para um volume final de 50 µL com água desmineralizada estéril. A reação de amplificação foi realizada em termociclador automático utilizando o ciclo: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento à temperatura de 62° C por 45 s e extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agar 1,0% (~6 V/cm por aproximadamente 40 min.), coradas com 0,5 µg/ mL de brometo de etídeo por 15 min e fotografadas sob luz UV para avaliação do amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração aproximada.

3.5 PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO PARA SEQUENCIAMENTO

Para a preparação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento foi realizada uma etapa de purificação que consistiu em preparar uma solução contendo 15 μL da amostra do produto de PCR, 30 μL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 45 μL de etanol 96 %. Um tubo plástico, apropriado para PCR, contendo esta solução foi colocado em gelo por 10 minutos e então centrifugado a 12100 xg por 20 min. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* (precipitado), foi adicionado etanol 70%. Este material foi submetido à centrifugação por mais 5 minutos, posteriormente o álcool retirado cuidadosamente com auxílio de pipetador automático e o *pellet* foi colocado para secar em bomba a vácuo. O *pellet* foi ressuscitado em 20 μL de água. O material obtido neste experimento foi utilizado na reação de sequenciamento.

3.6 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Foram usados na reação de sequenciamento 5 μL da amostra preparada no item 3.5, adicionando-se 4 μL do kit de sequenciamento ET (Applied Biosystem). Adicionou-se 1 μL de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam no sentido direto ou reverso da fita de DNA e colocados em tubos diferentes para que apenas uma das fitas seja amplificada em cada um dos tubos. O volume final da reação de sequenciamento foi de 10 μL . A reação de amplificação foi conduzida em termociclador automático com programa de temperatura específico: 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 60°C por 2 min. Após a reação concluída, este produto de amplificação foi conduzido à precipitação utilizando-se 10 μL do produto da reação de amplificação, 10 μL de água, 2 μL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60 μL de etanol 96 %. Esta solução foi submetida a centrifugação por 30

minutos a 12000 xg, posteriormente adicionou-se 200 µL de etanol 70 % para lavagem do *pellet*, secando-a em seguida em bomba a vácuo. Ao tubo plástico não se adicionou água. Os tubos contendo o pellet foram conduzidos ao seqüenciador automático para a reação de seqüenciamento.

3.7 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

3.7.1 MONTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CONTÍGUAS

A montagem das seqüências contíguas a partir das seqüências diretas e reversas foi feita utilizando-se os programas PHRED/PHRAP ou CAP3/CONSED em ambiente Linux, da seguinte maneira:

1. Criação dos diretórios: a partir de um diretório base, um diretório para cada estirpe (nomeada com o código da estirpe) foi criado e dentro destes diretórios, mais três sub-diretórios (“chromat_dir”, “edit_dir” e “phd_dir”), necessárias aos programas por padrão, foram adicionados. O diretório “chromat_dir” recebeu os arquivos tipo “.abi”. Este tipo de arquivo contém os cromatogramas oriundos do seqüenciador automático.
2. Execução do script “phredPhrap”: o processo de montagem é automatizado por um *script* em PERL, denominado “phredPhrap”, fornecido com o programa CONSED. Este script foi executado em linha de comando, a partir do diretório edit_dir de cada estirpe. O *script* se encarrega de executar os programas PHRED, PHRAP e CONSED em seqüência e com as opções de comando adequadas à maioria das montagens.
3. Chamada de bases e atribuição de qualidades: a primeira etapa da montagem é realizada pelo programa PHRED, que aceita arquivos de cromatograma (.abi) como entrada e executa a “chamada de bases” ou

basecalling, também atribuindo valores de qualidade para cada uma das bases. O programa PHRED gera como saída arquivos texto (contendo a chamada de bases e suas qualidades), com extensão “.phd” (Apêndice) que são armazenados no diretório “phd_dir”.

4. Montagem das seqüências contíguas: a montagem das seqüência contíguas é feita pelo programa PHRAP. Entretanto, este programa requer com entrada seqüências no formato FASTA. O programa PHD2FASTA converte antes os arquivos .phd para o formato FAST. O programa PHRAP gera as seqüências contíguas a partir de regiões de sobreposição entre as seqüências individuais, levando em consideração suas atribuições de qualidade. O programa PHRAP gera arquivos de saída contendo as seqüências e as qualidades das seqüência contíguas gerados, arquivos .fasta.screen.contigs e .fasta.screen.contigs.qual, respectivamente, um arquivo com a análise da montagem, .phrap.out, e um arquivo que pode ser usado como entrada para o programa CONSED, .fasta.screen.ace.1. Todos os arquivos gerados pelo PHRAP residem no diretório “edit_dir”. As montagens foram também realizadas com o programa CAP3. Este programa realiza a montagem de seqüência contíguas a partir dos arquivos .fasta.screen e .fasta. screen.qual e também gera um arquivo do tipo .ace que pode ser usado como entrada pelo CONSED.
5. Edição das montagens: as montagens obtidas com os programas PHRAP e CAP3 foram visualmente analisadas com o programa CONSED, em ambiente LINUX, e/ou com o programa BIOLIGN, em ambiente WINDOWS, e editadas para identificação e retirada das regiões correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores ou de regiões de baixa qualidade.

As seqüências contíguas foram obtidas através da montagem das seqüências parciais feitas a partir dos oligonucleotídeos iniciadores Y1, 16S362f, 16S786f, 16S1203f para o seqüenciamento da fita direta e dos oligonucleotídeos iniciadores Y2, Y3, 16S760r, 16S455r para o seqüenciamento da fita reversa do DNA.

Abaixo está descrita a hierarquia dos diretórios criada para a montagem das seqüências, exemplificada pela estirpe 100:

```
Diretório base
  /estirpe 100
    / chromat_dir
      cromatogramas.abi
    / edit_dir
      arquivo .fasta.screen.ace (arquivo de montagem)
      arquivo .fasta (todas as seqüências em formato FASTA)
      arquivo .fasta.screen (seqüências mascaradas para vetor)
      arquivo .fasta.screen.qual (qualidade das seqüências)
      arquivo .fasta.screen.contigs (contigs no formato FAST)
      arquivo .fasta.screen.contigs.qual (qualidade dos
      contigs)
      arquivo .phrap.out (informações sobre o processo de
      montagem)
      arquivo .screen.out (informações sobre vetores)
      arquivo .fasta.screen.cap.ace (montagem com o programa
      CAP3)
    / phd_dir
      arquivos.phd (possui os valores do basecall)
```

No quadro 2 há uma breve descrição das atribuições de cada um destes programas. A figura 2 mostra a seqüência de passos automatizados pelos quais as seqüências passam até a edição final no programa CONSED ou BioLign.

QUADRO 2: PROGRAMAS UTILIZADOS NA MONTAGEM E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO

Programa	Atribuições	Referência	Ambiente
PHRED	_ Ler os picos de fluorescência do sequenciador automático; Chamada de bases; Atribuir valor de qualidade a cada uma das bases de uma sequência.	http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html (EWING et al, 1998)	Linux
PHRAP	_ Leitura e montagem de leituras (reads)	http://www.phrap.org/phredphrap/phrap.html	Linux
CONSED	_ Edição das sequências contíguas	http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/consed.html (GORDON et al, 1998)	Linux
CAP3	_ Montagem de sequências contíguas	http://genome.cs.mtu.edu/cap/cap3.html (HUANG e MADAN, 1999)	Linux
Naive Bayesian Classifier	_ Comparar sequências de 16S rDNA com base na taxonomia proposta no Manual de sistemática bacteriológica do Bergey. 2ª edição.	http://rdp.cme.msu.edu/classifier/class_help.jsp#model	Internet
BLAST	_ Comparar de sequências de nucleotídeos ou proteínas; Cálculo de similaridade de sequência;	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=handbook.chapter.610 (ALTSCHUL et al, 1997)	Internet
ClustalW	Alinhamento de sequências	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ (THOMPSON et al, 1994)	Windows
Bioedit	Edição e análise de sequências	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html TOM HALL	Windows
BioLign	Edição, análise de contigs	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html	Windows
Mega3	Análise evolucionária molecular	http://www.megasoftware.net/	Windows

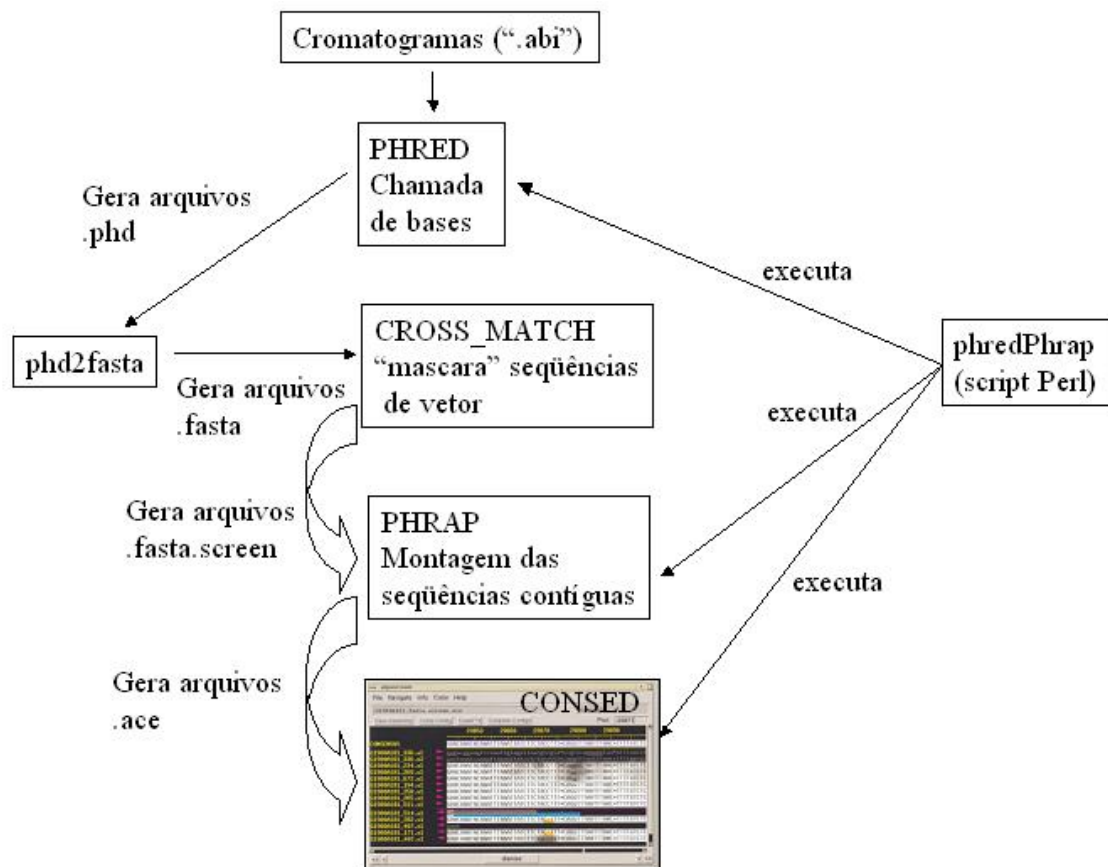
3.7.2 PESQUISA POR SIMILARIDADE

Para comparar as seqüências das estirpes isoladas de feijoeiro, com seqüências obtidas junto ao GenBank, banco de seqüências público (www.ncbi.nlm.nih.gov), e no site Ribosomal Database Project II (RDP II; rdp.cme.msu.edu). O banco de dados RDPII mantém apenas seqüências de 16S rDNA, atualizado pelo Genbank. Para a pesquisa no Genbank, foi utilizado o programa MEGABLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) (quadro 2), que compara várias seqüências simultaneamente, contidas em um único arquivo, contra um banco de dados de nucleotídeos. Este programa é utilizado para comparar seqüências que diferem muito pouco (ZHANG et al, 2000). Sendo assim, todas as seqüências contíguas Y1/Y2, seqüências individuais Y1 e Y2, e seqüências contíguas de outras regiões do gene 16S rDNA foram reunidas em um arquivo após terem sido editadas. Este arquivo foi utilizado na pesquisa por similaridade. O site RDPII mantém principalmente seqüências de estirpes tipo, e na busca não há muitas opções além da escolha do limite de confiança menor que 80%. O Genbank mantém todos os tipos de seqüências, além do 16S rDNA, e todos os tipos de estirpes. Na busca realizada pelo programa Blast, muitas opções podem ser modificadas pelo usuário. Estas opções incluem as formatações de saída do reultado da busca, em formato HTML, texto e outros formatos e opções avançadas de busca, como a opção de modificar o maior valor de *expect* e *wordsize*.

3.7.3 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

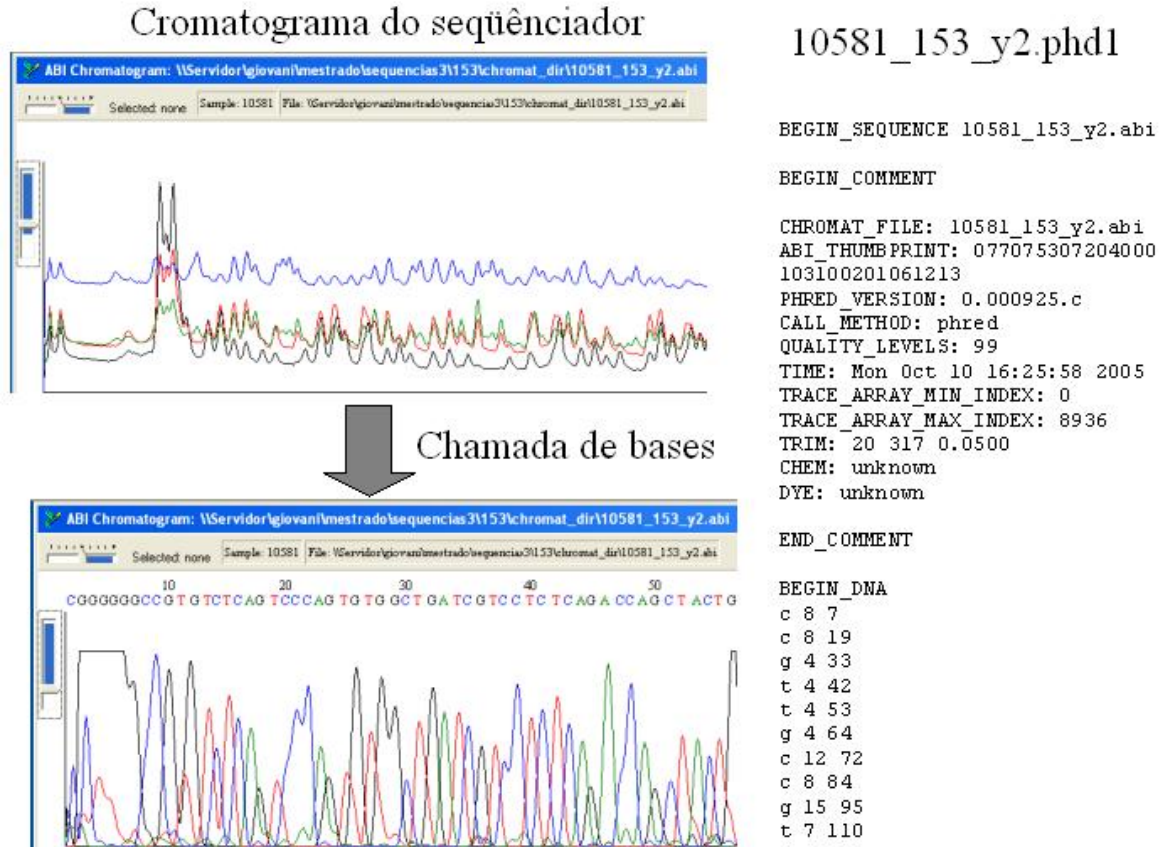
Com a obtenção das seqüências Y1 e Y2 das estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro, utilizadas neste trabalho, construiu-se árvores filogenéticas para avaliar a proximidade destas estirpes de outras espécies. Inicialmente utilizou-se o programa ClustalW para alinhar todas as seqüências das estirpes de feijoeiro com as respectivas seqüências de estirpes tipo e espécies mais similares. As seqüências alinhadas foram usadas para análise filogenética, através do método Neighbour-Joining, com um mínimo de 1000 amostras *bootstrap* a partir de uma matriz de distâncias com o número de diferenças entre os pares de seqüências alinhadas. O programa MEGA3 (KUMAR et al, 2004) foi utilizado para se construir estas árvores. No quadro 2 estão descritos os programas usados nas análises.

FIGURA 2: AUTOMATIZAÇÃO DOS PROGRAMAS PARA MONTAGEM E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RDNA DE ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO.



A figura mostra a sequência de passos pelos quais uma sequência é submetida. Estes passos iniciam com o script phredPhrap em linha de comando. Cada um dos programas mencionados dentro do retângulo gera um tipo de arquivo que é usado pelo próximo programa. Arquivos .phd gerados pelo phred são a entrada do programa phd2fasta, que por sua vez converte os arquivos .phd em formato fasta. Os arquivos .fasta.screen de saída do Cross_match são usados pelo phrap para a montagem das sequências contíguas. No programa consed os arquivos .ace (saída do phrap), que contém as sequências contíguas. Com a ajuda de uma interface gráfica é possível editar estas sequências contíguas.

FIGURA 3: CHAMADA DE BASES DO PROGRAMA PHRED.



Esta figura mostra as atribuições de qualidade para cada uma das bases, numa seqüência proveniente do seqüenciador automático. O programa Phred faz esta atribuição ou chamada de base (*basecall*). Do lado direito está mostrado o início de um arquivo de saída do programa Phred.

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DO 16S rDNA

A amplificação parcial do 16S rDNA dos isolados de nódulos de feijoeiro foi feita com as condições especificadas no item 3.4 (AMPLIFICAÇÃO DO 16S rDNA) do Material e Métodos. A amplificação foi testada em diferentes condições, com variação, principalmente de temperatura dos ciclos, com diferentes temperaturas para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e diferentes combinações de pares de oligonucleotídeos iniciadores. Inicialmente objetivou-se a amplificação de fragmentos com o par de oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y3, por esta combinação permitir a amplificação do maior fragmento possível (a partir dos oligonucleotídeos iniciadores disponíveis – quadro 1), com cerca de 1.500 pb (quadro 3). Entretanto, dentre as condições testadas, só obteve-se sucesso com temperatura de anelamento de 54°C. Mesmo assim, estas condições não foram reprodutíveis para muitas das estirpes (dados não mostrados). Novas tentativas foram realizadas, obtendo-se sucesso para a amplificação de um segmento menor do gene utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores 16S362f e Y3 que permitiram amplificar mais da metade do gene, aproximadamente 1.000 pb (quadro 2). O volume final para estas reações de amplificação foi de 50 µL, o que permitiu a precipitação do material e ressuspensão em 20 µL e a utilização de um conjunto de três pares de oligonucleotídeos iniciadores para o sequenciamento. Mesmo este último procedimento mostrou-se inadequado para a amplificação e sequenciamento de todas as estirpes, pois houve muita irregularidade na qualidade destas seqüências, possivelmente devido às diferenças de concentração de DNA amplificado entre uma reação e outra. Ainda assim um número considerável de seqüências pode ser obtido e analisado. Finalmente, os esforços foram concentrados no sentido de se obter a seqüência inicial do gene (ponta 5'), de aproximadamente 300

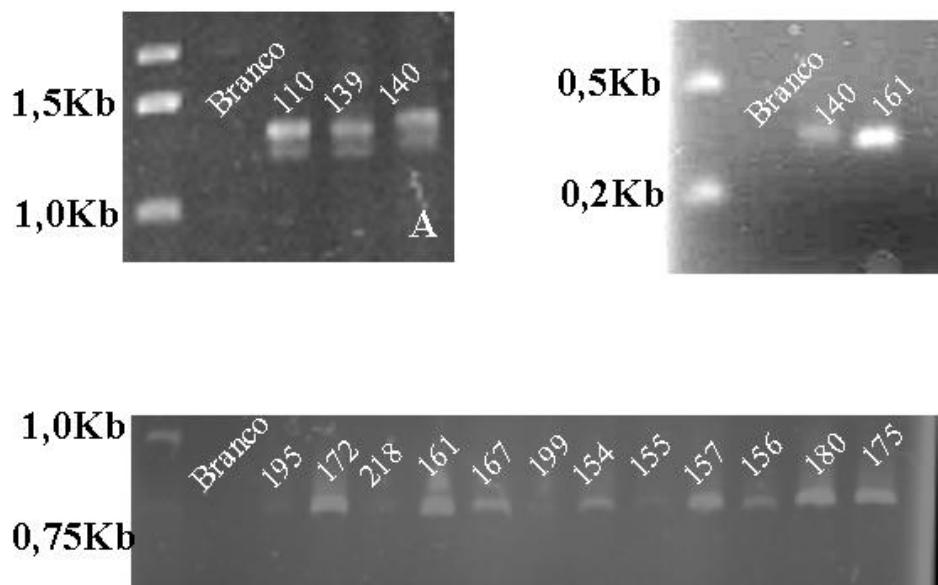
pb com o par de oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2. Posteriormente, as seqüências foram obtidas a partir dos fragmentos amplificados Y1/Y3, 16S362f/Y3 ou com os próprios oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação, Y1/Y2. Um volume final de 50 µL foi usado para as reações, permitindo sua precipitação e ressuspensão em 10 µL de água. Com apenas dois oligonucleotídeos iniciadores para o seqüenciamento, houve concentração suficiente de DNA e um maior número de seqüências puderam ser obtidas (Quadro 3). Na figura 2 estão mostrados os tamanhos de bandas aproximadas obtidos com a amplificação do 16S rDNA com as três combinações de oligonucleotídeos iniciadores.

QUADRO 3: COMBINAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DO 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO

Par de oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho aproximado do fragmento	Estirpes amplificadas ¹
Y1 e Y3	1.500 pb	88, 90, 91, 94, 98, 100, 102, 105, 107, 110, 111, 114, 119, 121, 122, 139, 140, 164,
16S362f e Y3	1.000 pb	140, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 164, 165, 167, 170, 172, 173, 176, 180, 188, 191, 194, 195, 199, 200, 205, 206, 213, 218
Y1 e Y2	300 pb	Todas as estirpes, exceto 218

¹ Estirpes para as quais foram obtidos fragmentos amplificados de 16S rDNA por PCR, usando o par de oligonucleotídeos iniciadores indicados na primeira coluna.

FIGURA 4: PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O 16S rDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.



A – produtos de amplificação para o 16S rDNA de isolados de nódulos de feijoeiro com os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y3; B - produtos de amplificação para o 16S rDNA de isolados de nódulos de feijoeiro com os oligonucleotídeos iniciadores 16S362f e Y3. C - produtos de amplificação para o 16S rDNA de isolados de nódulos de feijoeiro com os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2.

4.2 SEQUENCIAMENTO DO 16S rDNA

O total de reações de sequenciamento obtidas, em relação a cada um dos oligonucleotídeos iniciadores usados, é mostrado no Quadro 4. As seqüências foram reunidas de acordo com a estirpe para a qual pertenciam e foram submetidas a montagem automática de seqüências contíguas com o auxílio dos programas PHRED, PHRAP ou CAP3 e CONSED (ver item 4.3.1, Montagem das seqüências contíguas). Devido à qualidade das seqüências, não foi possível o aproveitamento de todas as seqüências na montagem. A região contígua que foi obtida para cada estirpe está mostrada no Quadro 4. O maior número de seqüências contíguas obtidas refere-se à região inicial do 16S rDNA, compreendendo o intervalo entre o par de oligonucleotídeos iniciadores Y1/Y2. Das 48 estirpes para as quais foram obtidas seqüências, 33 foram seqüenciadas com o par Y1/Y2. Outras 6 estirpes foram seqüenciadas somente com o oligonucleotídeo iniciador Y1 (estirpes 100, 108 e 121) ou somente com o oligonucleotídeo iniciador Y2 (estirpes 159, 167, 204). Finalmente, 10 estirpes foram seqüenciadas com outras combinações de oligonucleotídeos iniciadores, abrangendo regiões maiores e/ou diferentes da região Y1/Y2: estirpe 153, região Y1/Y3; estirpe 154, 157, 160 e 176, região 16S1203f/Y3; estirpes 161, região 16S786F/16S1203F; estirpe 170, região 16S786f/Y3; estirpe 173, região 16S362f/16S786f; estirpes 199, 206 e 170, região 16S362f/16S760r; e estirpe 172, região 16S455r/Y3. As seqüências obtidas de Y1 e Y2 que possuíam boa qualidade puderam ser montadas, formando uma seqüência contígua (quadro 4). Estas seqüências contíguas possuindo em média 300 pb foram analisadas por busca de similaridade bem como para as análises filogenéticas, na construção das árvores filogenéticas.

QUADRO 4: TOTAL DE SEQÜÊNCIAS OBTIDAS POR OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA O SEQÜENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE 16S RDNA DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO.

Direção dos oligonucleotídeos iniciadores	Nome do oligonucleotídeo iniciador	Número de seqüências	Numero de seqüências utilizadas
Oligonucleotídeos iniciadores diretos	Y1	75	45
	16S362f	16	4
	16S786f	27	3
	16S1203f	31	7
	SUB TOTAL	149	59
Oligonucleotídeos iniciadores reversos	Y2	75	47
	Y3	31	5
	16S760r	31	4
	16S455r	19	4
	SUB TOTAL	156	60
	TOTAL	305	119

O número de seqüências refere-se ao total obtido para cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, portanto estes números não fazem menção a estirpes de nódulos de feijoeiro individualmente

4.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

4.3.1 MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS

Os programas PHRAP e CAP3 foram utilizados com a mesma finalidade, de montar sequências contíguas a partir de um conjunto de sequências de uma mesma região do DNA, contendo fragmentos de sobreposição em suas extremidades. Em geral, o resultado obtido para ambos os programas foi idêntico, mas em alguns casos a montagem foi melhor em um ou outro. Nestes casos, a melhor montagem foi usada para edição. Normalmente, neste ponto, ocorre uma etapa anterior, executada pelo programa CROSS_MATCH, para identificar e mascarar sequências de vetores. Devido ao sequenciamento ter sido feito diretamente a partir dos amplificadores, sem clonagem, não houve necessidade de “mascarar” nenhuma sequência de plasmídeo. No diretório “edit_dir” foram colocados, automaticamente, os arquivos que resultaram da montagem e puderam ser analisados e editados no programa CONSED. Os programas PHRED/PHRAP e CAP3 foram executados automaticamente, sem a interferência do usuário. Já o programa CONSED possui interface gráfica, onde é possível conferir visualmente a qualidade da sequência e editá-la, tendo sido usado para avaliar, detectar problemas diversos e retirar a região que corresponde aos oligonucleotídeos iniciadores nas montagens, pois estas regiões são indiferentes à análise filogenética. O programa CONSED mostra a região onde a qualidade da sequência foi melhor sendo possível selecionar apenas esta região, mesmo que os oligonucleotídeos iniciadores não tenham sido identificados. Estando estas sequências já editadas, a região adequada foi exportada e salva em um formato FASTA e posteriormente usada nas análises. Parte da edição foi feita em ambiente Windows, com o programa BIOLIGN, que

também permite visualizar as seqüência contíguas obtidos com o programa PHRAP ou CAP3. Na tabela 2 estão descritos estes resultados obtidos pela edição nos programas mencionados acima. A edição das seqüências levou em conta a região de alta qualidade para a seqüência contígua determinada pelo CONSED (última coluna da tabela 2). Entretanto, na maior parte dos casos uma extensão maior da região contígua foi usada após verificação visual.

As seqüências obtidas por esta metodologia puderam então ser utilizadas para as análises de busca por similaridade e construção de árvores filogenéticas (quadro 5).

QUADRO 5: SEQUENCIAS DO GENE 16S RDNA DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO, UTILIZADAS NAS ANALISES DE BUSCA POR SIMILARIDADE E FILOGENIA.

Estirpe	Seqüências obtidas ¹	Região contígua analisada ²	Extensão da região contígua (pb)	Qualidade média da região contígua ³	OBS.
87	Y1 e Y2	Y1 / Y2	307	64,5	Completa
89	Y1 e Y2	Y1 / Y2	335	60,6	Completa
90	Y1 e Y2	Y1 / Y2	310	58,2	Completa
91	Y1 e Y2	Y1 / Y2	331	60,3	Completa
92	Y1 e Y2	Y1 / Y2	309	38,0	Completa
94	Y1 e Y2	Y1 / Y2	341	52,7	Completa
98	Y1 e Y2	Y1 / Y2	315	57,8	Completa
100	Y1 e Y2	Y1	261		
101	Y1 e Y2	Y1	193	20,1	
102	Y1 e Y2	Y1 / Y2	309	52,9	Completa
104	Y1 e Y2	Y1 / Y2	302	53,5	Completa
107	Y1 e Y2	Y1 / Y2	343	79,6	Completa
108	Y1 e Y2	Y1	292		
109	Y1 e Y2	Y1 / Y2	311	58,0	Completa
110	Y1 e Y2	Y1 / Y2	331	80,2	Completa
111	Y1 e Y2	Y1 / Y2	334	58,6	Completa
114	Y1 e Y2	Y1 / Y2	304	70,7	Completa
119	Y1 e Y2	Y1 / Y2	334	64,4	Completa
121	Y1 e Y2	Y2	278		
126	Y1 e Y2	Y1 / Y2	307	53,3	Completa
127	Y1 e Y2	Y1 / Y2	329	59,4	Completa
130	Y1 e Y2	Y1 / Y2	338	65,9	Completa
132	Y1 e Y2	Y1 / Y2	331	61,9	Completa
140	Y1 e Y2	Y1 / Y2			
149	Y1 e Y2	Y1 / Y2	310	60,1	Completa
153	16S1203f, Y3, 16S455r, 16S760r, 16S786f, Y1 e Y2	Y1 / Y3	1484		Completa.
154	Y3 e 16S362f	16S1203f/Y3	210	28,7	Ponta 5´ incompleta; ponta 3´ incompleta
155	Y1 e Y2	Y1 / Y2	248	30,4	
156	Y1 e Y2	Y1 / Y2	309	59,9	Completa
157	Y1 e Y2	16S1203f/Y3	339	79,7	Completa
159	Y1 e Y2, 16S1203f, 16S760r, 16S786f e Y3	Y2	266		
160	Y3, 16S1203f e 16S455r	16S1203f/Y3	1122	54,2	
	Y1 e Y2	Y1 / Y2	330	49,6	Completa
continua					

QUADRO 5: SEQUENCIAS DO GENE 16S RDNA DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO, UTILIZADAS NAS ANALISES DE BUSCA POR SIMILARIDADE E FILOGENIA.

Estirpe	Seqüências obtidas ¹	Região contígua analisada ²	Extensão da região contígua (pb)	Qualidade média da região contígua ³	OBS.
161	16S786f e 16S1203f	16S786f / 16S1203f	677	29,9	
	Y1 e Y2	Y1 / Y2	331	65,5	Completa
164	Y1 e Y2	Y1 / Y2	323	52,6	Completa
167	Y3, 16S760r, 16S1203f, 16S362f, 16S786f, 16S455r, Y1 e Y2	Y2	272		
170	Y3 e 16S786f	Y3 / 16S786f	720	35,0	
	760r e 362f	760r / 16S362f	408	22,1	
172	Y3, 16S455r, 16S362f, 16S786f e 16S1203f	Y3 / 16S455r	1059	45,3	
173	Y1eY2	Y1/Y2	338	61,2	
	16S786fE16S362f	16S786f/16S362f	670	24,4	
176	Y3 e 1203f	Y3 / 16S1203f	271	23,8	
180	Y1 e Y2	Y1 / Y2	342	83,8	Completa
189	Y1 e Y2	Y2	832		
194	Y1 e Y2	Y1 / Y2	355	28,2	Completa
195	Y1 e Y2	Y1 / Y2	281	48,1	Completa
199	Y1 e Y2	Y1 / Y2	288	71,4	Completa
	16S760r e 16S362f	16S760r / 16S362f	417	59,5	
200	Y1 e Y2	Y1 / Y2	299	42,3	Completa
204	Y1 e Y2	Y2	319		
206	760r, 362f e 455r	362f e 760r	1149	58,3	
	Y1 e Y2	Y1 / Y2	330	31,5	Completa
213	Y1 e Y2	Y1 / Y2	305	79,6	Completa

1 Refere-se aos oligonucleotídeos iniciadores que foram usados nas reações de sequenciamento;

2 Região contígua obtida após montagem das seqüências com o programa PHRAP/CAP3 – referem-se sempre ao maior fragmento com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores usados;

3. Qualidade média (dada pelo Biolign) obtida para a região contígua sem edição.

4. A região contígua foi considerada “completa” quando foi possível identificar os oligonucleotídeos iniciadores nas suas extremidades.

TABELA 2: MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DE 16S RDNA DE ISOLADOS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO.

Estirpe	Sequência contígua	Tamanho do sequência contígua (pb)	Leitura	Tamanho da leitura (pb)	Posição inicial	Posição final	Direção	Taxa de erro	Região de alta qualidade
87	1	724	Y1 Y2	757 704	424 0	1180 703	U C	6,98x10-3 1,66x10-2	411-717
89	1	1151	Y1 Y2	747 729	445 1	1191 729	U C	1,83x10-2 1,90x10-2	437-769
90	1	701	Y1 Y2	681 724	21 -408	701 315	U C	1,39x10-2 1,74x10-3	11-312
91	1	779	Y1 Y2	787 782	-7 -478	779 303	U C	6,55x10-4 9,85x10-4	3-333
92	1	1114	Y1 Y2	747 743	370 -87	1116 655	U C	1,96x10-2 3,17x10-2	362-659
94	1	1054	Y1 Y2	749 726	405 1	1153 726	U C	5,42x10-3 4,11x10-3	404-739
98	1	739	Y1 Y2	728 719	12 -404	739 314	U C	5,16x10-3 2,78x10-3	2-316
102	1	1129	Y1 Y2	717 721	413 -21	1129 699	U C	2,08x10-2 7,93x10-3	392-700
104	1	1163	Y1 Y2	760 714	404 -26	1163 687	U C	4,00x10-3 2,13x10-2	408-710
107	1	701	Y1 Y1 Y2 Y2	882 681 712 818	72 21 -390 -533	953 701 321 284	U U C C	7,93x10-2 4,04x10-2 1,44x10-2 4,99x10-3	1-342
109	1	743	Y1 Y2	731 672	13 -381	743 290	U C	3,55x10-3 2,91x10-2	6-312
110	1	828	Y1 Y1 Y1 Y2 Y2 Y2	726 775 792 830 789 691	502 505 556 -96 1 88	1227 1279 1347 733 789 778	U U U C C C	6,96x10-3 3,18x10-3 3,92x10-2 1,03x10-1 7,77x10-3 2,81x10-2	495-820
111	1	333	Y1 Y2	721 722	-24 -388	696 333	U C	3,03x10-3 6,22x10-3	
114	1	754	Y1 Y2	755 749	426 1	1180 749	U C	4,60x10-4 1,20x10-4	445-746
119	1	804	Y1 Y2	813 830	-8 -495	804 334	U C	2,99x10-3 3,93x10-3	5-337
126	1	1166	Y1 Y2	746 742	422 1	1167 742	U C	6,91x10-3 4,06x10-3	429-735
127	1	259	Y1 Y1 Y2 Y2	792 732 715 719	430 437 1 1	1221 1168 715 719	U U C C	1,46x10-2 1,88x10-2 2,79x10-2 1,96x10-2	435-766
130	1	757	Y1 Y2	720 757	396 1	1115 757	U C	5,21x10-4 5,10x10-4	408-712

continua

continuação

TABELA 2: MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DE 16S RDNA DE ISOLADOS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO.

Estirpe	Sequência contígua	Tamanho do sequência contígua (pb)	Leitura	Tamanho da leitura (pb)	Posição inicial	Posição final	Direção	Taxa de erro	Região de alta qualidade
132	1	323	Y1 Y2	727 712	1 -388	727 323	U C	1,37x10 ⁻³ 4,02x10 ⁻⁴	38-289
140	1	627	Y1 Y2	825 758	316 -127	1140 630	U C	6,96x10 ⁻³ 1,49x10 ⁻³	308-606
149	1	1253	Y1 Y2	757 779	497 1	1253 779	U C	2,92x10 ⁻³ 7,52x10 ⁻³	488-790
153	1	2019	Y1 Y2 786f 1203f 1203f Y1 Y2 760r 455r Y3	793 840 928 966 752 815 765 985 857 841	540 602 1293 1703 1710 1 89 389 850 1087	1332 1441 2220 2668 2461 815 853 1373 1706 2027	U C U U U U C C C C	5,30x10 ⁻⁴ 4,90x10 ⁻² 1,27x10 ⁻² 5,73x10 ⁻³ 1,28x10 ⁻¹ 7,12x10 ⁻² 8,59x10 ⁻⁴ 1,64x10 ⁻¹ 7,22x10 ⁻² 4,19x10 ⁻³	532-2006
154	1	258	Y3 1203f	904 786	-110 -524	793 261	C U	9,48x10 ⁻² 7,74x10 ⁻²	24-232
155	1	643	Y1 Y2	763 890	1 -510	763 379	U C	2,64x10 ⁻² 1,08x10 ⁻¹	49-280
	2	317	786f 1203f	796 783	-411 1	384 783	U U	6,97x10 ⁻² 2,56x10 ⁻²	26-257
156	1	777	Y1 Y2	756 763	22 -473	777 289	U C	3,73x10 ⁻³ 5,17x10 ⁻²	10-318
157	1	669	Y1 Y1 Y2 Y2	749 813 827 712	15 75 -548 -387	763 887 278 324	U U C C	2,83x10 ⁻⁴ 6,55x10 ⁻² 1,05x10 ⁻¹ 1,94x10 ⁻⁴	2-345
160	1	927	Y1 Y2	838 831	655 1	1492 831	U C	4,63x10 ⁻² 8,20x10 ⁻²	599-901
	2	1437	Y3 455r 760r 1203f 362f	690 729 689 717 744	51 414 767 -397 417	740 1142 1455 319 1160	C C C U U	1,43x10 ⁻³ 1,09x10 ⁻³ 1,05x10 ⁻² 1,98x10 ⁻³ 1,87x10 ⁻³	7-1105
161	1	753	Y1 Y2	727 768	27 -431	753 336	U C	8,12x10 ⁻⁴ 1,18x10 ⁻³	4-333
	2	1126	786f 1203f	789 851	-119 277	669 1127	U U	6,29x10 ⁻² 1,05x10 ⁻¹	28-694
164	1	744	Y1 Y2	727 731	19 -437	745 293	U C	5,22x10 ⁻³ 3,36x10 ⁻²	3-309

continua

continuação

TABELA 2: MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DE 16S RDNA DE ISOLADOS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO.

Estirpe	Sequência contígua	Tamanho do sequência contígua (pb)	Leitura	Tamanho da leitura (pb)	Posição inicial	Posição final	Direção	Taxa de erro	Região de alta qualidade
170	1	531	786f	531	1	531	U	3,38x10 ⁻²	79-455
	2	754	362f 760r	456 813	299 1	754 813	U C	3,35x10 ⁻² 1,69x10 ⁻¹	332-523
	3	1123	786f 1203f 1203f Y3	846 842 422 789	-157 289 444 1	688 1130 865 783	U U U C	1,70x10 ⁻¹ 1,30x10 ⁻¹ 3,67x10 ⁻² 1,32x10 ⁻¹	236-708
172	1	1553	362f 786f 1203f 455r Y3	679 830 869 1011 896	1 282 696 -75 314	679 1111 1564 935 1209	U U U C C	6,91x10 ⁻⁴ 1,15x10 ⁻¹ 4,27x10 ⁻² 3,37x10 ⁻¹ 2,12x10 ⁻¹	23-1075
173	1	785	Y1 Y2	761 762	25 -432	875 329	U C	3,54x10 ⁻³ 2,06x10 ⁻⁴	10-345
	2	1206	786f 1203f	871 899	-106 309	764 1207	U U	6,59x10 ⁻² 1,17x10 ⁻¹	13-432
176	1	475	1203f Y3	557 452	-81 -158	475 293	U C	4,42x10 ⁻² 9,54x10 ⁻²	34-203
180	1	1203	Y1 Y1 Y1 Y2 Y2 Y2	815 818 797 817 800 734	396 408 413 -81 -65 1	1210 1225 1209 735 734 734	U U U C C C	1,53x10 ⁻² 5,79x10 ⁻² 8,45x10 ⁻⁴ 4,56x10 ⁻² 8,54x10 ⁻⁴ 1,56x10 ⁻²	393-736
194	1	757	Y1 Y2	757 813	1 -524	757 288	U C	5,04x10 ⁻² 3,55x10 ⁻²	18-286
195	1	829	Y1 Y2	814 779	20 -454	833 824	U C	5,75x10 ⁻⁴ 8,06x10 ⁻²	39-318
199	1	770	Y1 Y2	789 807	-18 -521	770 285	U C	9,44x10 ⁻³ 1,55x10 ⁻²	13-264
	2	438	760r 362f	539 454	-100 -73	438 380	C U	2,78x10 ⁻³ 3,92x10 ⁻²	1-386

continua

TABELA 2: MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS CONTÍGUAS DE 16S RDNA DE ISOLADOS DE NÓDULO DE FEIJOEIRO.

Estirpe	Sequência contígua	Tamanho do sequência contígua (pb)	Leitura	Tamanho da leitura (pb)	Posição inicial	Posição final	Direção	Taxa de erro	Região de alta qualidade
200	1	815	Y1 Y2	820 782	1 -502	820 278	U C	4,72x10 ⁻³ 1,01x10 ⁻¹	39-289
206	1	832	Y1 Y2	717 721	413 -21	1129 699	U C	2,09x10 ⁻² 7,53x10 ⁻³	392-700
	2	1632	362f 786f 1203f 760r 455r Y3	729 737 792 694 725 725	1 429 856 -284 43 436	724 1165 1647 409 767 1160	U U U C C C	3,98x10 ⁻³ 8,56x10 ⁻⁴ 3,14x10 ⁻³ 3,04x10 ⁻² 4,83x10 ⁻³ 5,49x10 ⁻³	21-1159
213	1	1213	Y1 Y1 Y2 Y2	749 782 787 738	475 477 1 34	1223 1258 787 771	U U C C	1,88X10 ⁻² 1,45X10 ⁻² 1,09X10 ⁻³ 1,94X10 ⁻²	417-777

U: oligonucleotídeo iniciador universal (direto). Direção 3'-5'; C: oligonucleotídeo iniciadore complemento (reverso): Direção 5'-3' ; Taxa de erro: probabilidade de 1 erro em 10000 bases: oligonucleotídeos iniciadores
(<http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/distributions/README.15.0.txt>)

4.3.2 MONTAGEM DA SEQUÊNCIA PARA A ESTIRPE 199

A estirpe 199 foi amplificada com o par de oligonucleotídeos iniciadores 16S362f/Y3 e Y1/Y2 e posteriormente sequenciada com os oligonucleotídeos iniciadores: 786f, 455r, 362f, 760r, 1203f, Y3, Y1 e Y2. Entretanto a montagem automática produziu duas sequências contíguas: “Sequência contígua1”, formado pelas sequências a partir dos oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2; e “Sequência contígua2”, formado pelas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores 16S362f e 760r. Ambas as sequências contíguas geraram similaridade com sequências de 16S rDNA de *Rhizobium tropici* quando comparadas com o GenBank através do programa BLAST (dado não mostrado). Desta forma, a sequência de 16S rDNA de *Rhizobium tropici*, subgrupo II B, estirpe LMG (número de acesso no GenBank X67233), foi usada para alinhamento com as sequências contíguas obtidas, o que permitiu unir as duas sequências contíguas e estender a sequência até 680 pb (após a retirada das sequências correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores Y1 e 16S760r). Este artifício foi necessário pois o ponto de junção entre as sequências contíguas foi de apenas 6 bases, não sendo possível sua montagem automática. O alinhamento é mostrado na figura 5.

FIGURA 5: ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE 16S RDNA DAS REGIÕES CONTÍGUAS OBTIDAS PARA O ISOLADO DE NÓDULO DE FEIJOEIRO 199 COM A SEQUÊNCIA *RHIZOBIUM TROPICI*.

	10	20	30	40	50	60	70	80
R. tropici							
Consenso	AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGT							
contig1	---AACGCTGGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGT							
contig2	-----							

	90	100	110	120	130	140	150	160
R. tropici							
Consenso	GGGAATCTACCTTTTGCTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTTCCTTCGGGAGAAAGATTATC							
contig1	GGGAATCTACCTTTTGCTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTTCCTTCGGGAGAAAGATTATC							
contig2	-----							

	170	180	190	200	210	220	230	240
R. tropici							
Consenso	GGCAAGAGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAG							
contig1	GGCAAGAGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAG							
contig2	-----							

	250	260	270	280	290	300	310	320
R. tropici							
Consenso	AGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGGCCAACT-CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGG							
contig1	AGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGGCCAACTTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGG							
contig2	-----ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGG							

	330	340	350	360	370	380	390	400
R. tropici							
Consenso	GCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGA							
contig1	GCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGA							
contig2	GCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGA							

	410	420	430	440	450	460	470	480
R. tropici							
Consenso	CGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATT							
contig1	CGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATT							
contig2	CGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATT							

FIGURA 5: ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE 16S RDNA DAS REGIÕES CONTÍGUAS OBTIDAS PARA O ISOLADO DE NÓDULO DE FEIJOEIRO 199 COM A SEQUÊNCIA *RHIZOBIUM TROPICI*.

```

          490      500      510      520      530      540      550      560
R. tropici  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Consenso   ACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCCTGGAACGTCCTTTGATA
contig1    -----
contig2    ACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCCTGGAACGTCCTTTGATA

          570      580      590      600      610      620      630      640
R. tropici  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Consenso   CTGTTCGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTCAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAG
contig1    -----
contig2    CTGTTCGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTCAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAG

          650      660      670      680      690      700      710      720
R. tropici  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Consenso   TGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTA
contig1    -----
contig2    TGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG-----

```

R. tropici – sequência de 16S rDNA de *Rhizobium tropici*, subgrupo IIB, estirpe LMG 9518 (número de acesso no GenBank X67233); a sequência possui 1.432 pb e é mostrada parcialmente; Consenso – sequência consenso para as sequências contíguas 1 e 2; sequência contígua1 e sequência contígua2 – sequências contíguas obtidas por montagem automática com o programa CAP3, a partir das sequências com os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2 (sequência contígua1) e 362f e 760r (sequência contígua2); a região de sobreposição entre as sequências contíguas está destacada em amarelo.

4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO POR ANÁLISE DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DE 16S rDNA

Há uma quantidade crescente de sequências depositadas em bancos de dados públicos que auxiliam na identificação taxonômica de um organismo através da comparação entre sequências de DNA ou proteína. Alguns destes bancos de dados são especializados, mantendo apenas sequências de RNA ribossomais, por exemplo, como é o caso do Ribosomal Database Project (RDP II; <http://rdp.cme.msu.edu>). Outros como o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mantém sequências de qualquer tipo, independentemente do organismo ou região cromossômica. Para a comparação e análise de uma sequência qualquer com a enorme quantidade de sequências nos bancos de dados, conta-se com ferramentas especializadas de bioinformática, dentre as quais destacam-se os programas Seqmatch e classifier do RDP II e o BLAST no Genbank.

4.3.3.1 HIERARQUIA TAXONÔMICA: RESULTADO DA ANÁLISE DO RIBOSOMAL DATABASE PROJECT (RDP II)

Uma identificação taxonômica das sequências foi realizada, sendo possível obter um resultado bastante geral pela pesquisa de sequências no site Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>). A saída do programa do RDP II é estruturada de acordo com os vários níveis taxonômicos encontrados, fornecendo, desta maneira, uma visão bastante ampla dos organismos com que se está trabalhando. O programa utilizado pelo RDP como classificador é o Naive Bayesian rRNA Classifier (Versão 1.0, Novembro 2003) e a taxonomia hierárquica tem por padrão o Manual de sistemática bacteriológica Bergey ((GARRITY et al., 2004); <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>). Este classificador utiliza um limite de

confiança de 80%. Portanto, seqüências com os valores abaixo deste limite foram consideradas não classificadas naquele determinado *taxon*. Por exemplo, a estirpe 159 não foi classificada em nenhum filo bacteriano, apesar do limite de confiança obtido na classificação de Proteobactérias ter sido de 78%. A estirpe 130 obteve um limite de confiança de 100% dentro da ordem Actinomycetales, 100% na família Microbacteriaceae, porém foi considerada como um gênero não classificado, atingindo 63% no gênero *Microbacterium*. O resultado do limite de confiança para todas as estirpes e os respectivos gêneros está exposto na tabela 3. Foram submetidas 48 seqüências. Deste modo a distribuição em filos foi de apenas uma estirpe pertencente às Actinobactéria, 42 Proteobactérias e 5 estirpes não puderam ser agrupadas em Filos. Entre as Proteobactérias, apenas uma estirpe pertence à Subdivisão Gama. Na classificação das Betaproteobactérias, houve a ocorrência de 8 estirpes pertencentes ao gênero *Ralstonia* e três do gênero *Burkholderia*, além de uma estirpe não classificada. Dentre as Alphaproteobactérias classificadas, a grande maioria das estirpes pertence ao gênero *Rhizobium* (20), além de uma estirpe pertencente família Sphingomonadaceae não classificada. Estão incluídas ainda várias estirpes pertencentes às α -proteobactérias não classificadas (tabela 3). Todos os resultados obtidos por esta pesquisa estão resumidos nos gráficos de 1, 2 e 3. a presença de grande número de estirpes pertencentes ao gênero *Rhizobium* era esperada, pois a simbiose entre estas bactérias e as leguminosas é conhecida desde o final do século XIX. Entretanto o restante das estirpes pertence a gêneros que possuem representantes presentes nos mais diversos habitats e nichos. O gênero *Ralstonia* possui bactérias que são patógenos de plantas e outras que associam-se a leguminosas e fixam nitrogênio, bem como o gênero *Burkholderia*. Outros gêneros obtiveram limites de confiança muito baixos para se ter certeza da sua presença nos nódulos de feijoeiro.

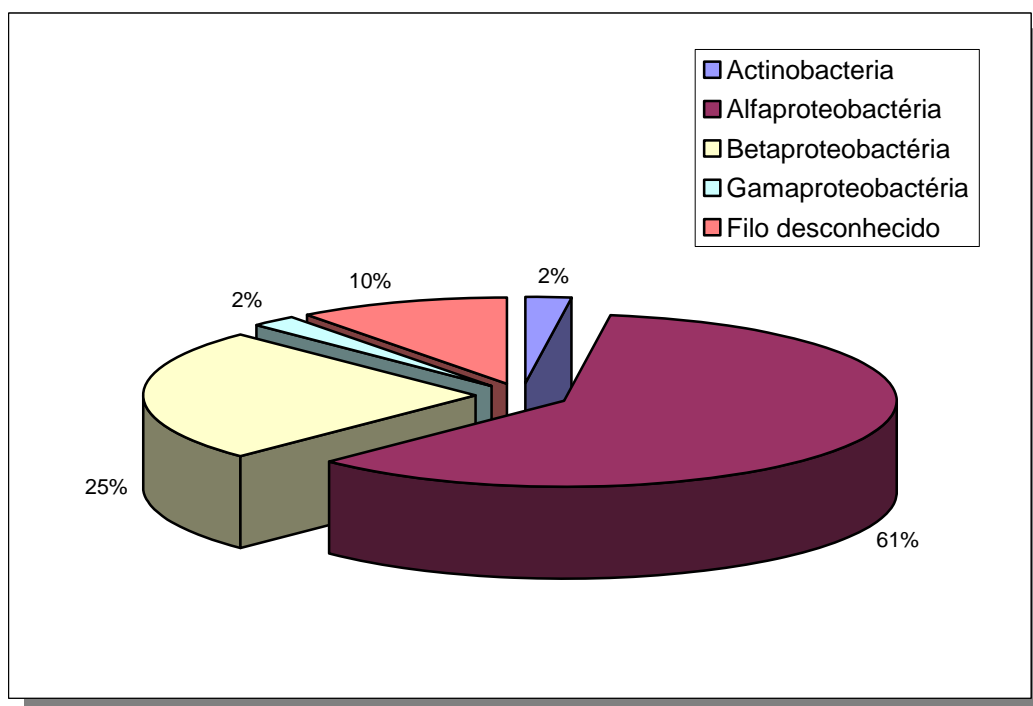
TABELA 3: RESUMO DOS LIMITES DE CONFIANÇA ATINGIDOS PELAS ESTIRPES ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJOEIRO.

ESTES RESULTADOS FORAM OBTIDOS NA PESQUISA TAXONÔMICA CLASSIFIER DO RDP II ([HTTP://RDP.CME.MSU.EDU/](http://RDP.CME.MSU.EDU/)).

Estirpe	Gênero	Limite	Estirpe	Gênero	Limite
130	<i>Microbacterium</i> (Microbacteriaceae)	63%	87	<i>Rhizobium</i>	99%
206	<i>Pseudomonas</i> (Gamaproteobactéria)	73%	89		99%
119	<i>Burkholderia</i>	100%	90		98%
161			91		100%
172			98		95%
94	<i>Ralstonia</i>	100%	102		98%
107			104		96%
111			109		99%
140			110		96%
153			114		97%
157			127		99%
173			132		97%
180			149		96%
204			<i>Limnobacter</i> (Betaproteobactéria)		31%
194	<i>Sandaricinobacter</i> (Sphingomonadaceae)	48%	160		96%
126	<i>Rhizobium</i>	63%	164		98%
200	(Rhizobiaceae)	77%	170		97%
92	<i>Chelotobacter</i>	34%	195		100%
121	(Rhizobiales)	54%	199		99%
154	<i>Brucella</i>	64%	213		98%
176	(Rhizobiales)	67%			
167	<i>Defluviobacter</i> (Rhizobiales)	50%			
100	<i>Desulfofustis</i> (Bacteria)	4%			
101	<i>Alterococcus</i> (Bacteria)	5%			
108	<i>Xenophilus</i> (Bacteria)	4%			
155	<i>Rhizobium</i> (Alfaproteobactéria)	12%			
159	<i>Defluviobacter</i> (Bacteria)	21%			
189	<i>Thiococcus</i> (Bacteria)	3%			

De um total de 48 estirpes, a maior parte (23 estirpes, 48%) puderam ser classificadas no gênero *Rhizobium*. O restante das estirpes (25 estirpes, 52%) foram classificadas em gêneros diversos.

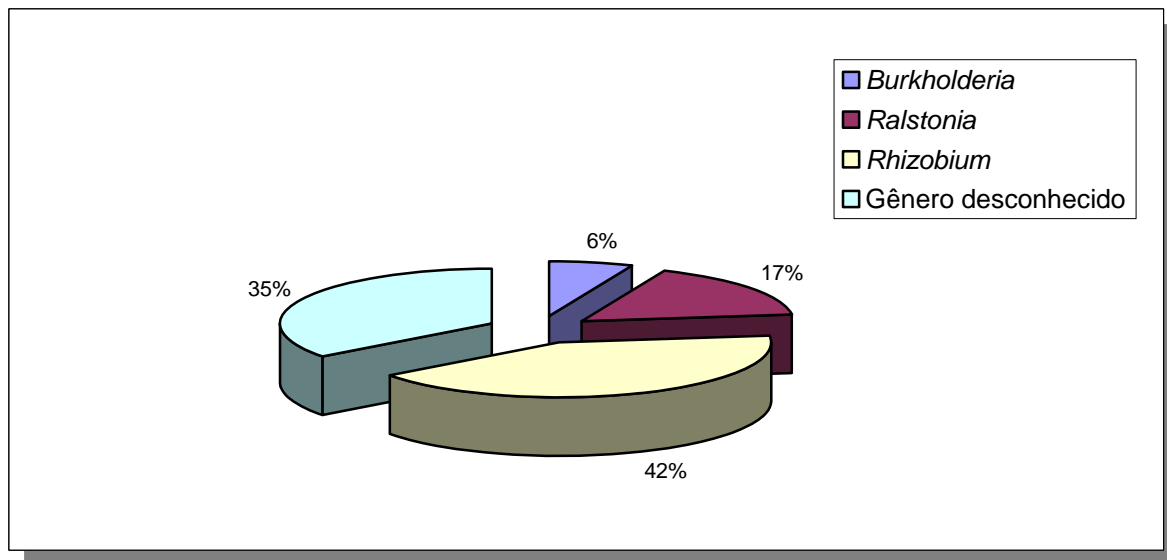
GRÁFICO 1. DISTRIBUIÇÃO TAXONÔMICA EM FILOS E CLASSES DAS SEQUÊNCIAS DE 16S RDNA DE ESTIRPES ISOLADAS DE FEIJOEIRO DE ACORDO COM OS RESULTADOS DA ANÁLISE DO PROGRAMA CLASSIFIER DO RDP II ([HTTP://RDP.CME.MSU.EDU/](http://rdp.cme.msu.edu/)).



Das 48 seqüências submetidas para consulta, 5 estirpes não puderam ser classificadas em filos. Actinobacteria: 1 estirpe classificada; Proteobacteria: 42 estirpes classificadas (alfaproteobacteria: 29; betaproteobacteria: 12; gamaproteobacteria: 1).

Com exceção de uma única estirpe (estirpe 130), classificada como Actinobactéria, típica de solo, todas as outras foram classificadas entre as Proteobactérias. A maior parte pertence à classe das Alfaproteobactérias, à qual pertence o gênero *Rhizobium*. Houve um número significativo de representantes das Betaproteobactérias.

GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO TAXONÔMICA ENTRE GÊNEROS DAS SEQUÊNCIAS DE 16S RDNA DE ESTIRPES ISOLADAS DE FEIJOEIRO DE ACORDO COM OS RESULTADOS DA ANÁLISE DO PROGRAMA CLASSIFIER DO RDPII ([HTTP://RDP.CME.MSU.EDU/](http://RDP.CME.MSU.EDU/)).

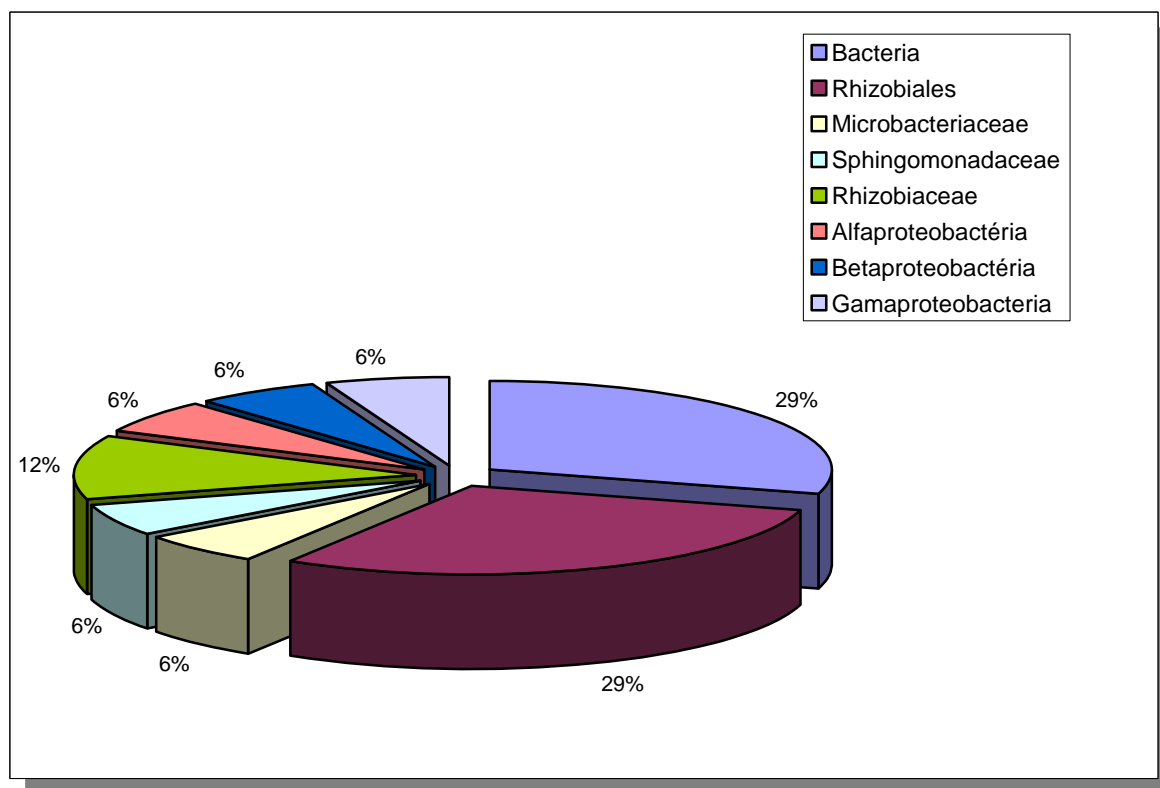


Burkholderia: 3 estirpes atingiram limite de confiança superior a 80 % para este gênero

Ralstonia: 8 estirpes; *Rhizobium*: 20 estirpes; Desconhecido: 17 estirpes não foram classificadas em gêneros.

Apesar da grande diversidade encontrada, um número considerável de estirpes não puderam ser classificadas em gêneros (gráfico 3). Só foi possível a classificação em apenas três gêneros: *Ralstonia* e *Burkholderia* (Betaproteobactérias) e *Rhizobium* (Alfaproteobactéria).

GRÁFICO 3: DISTRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DAS SEQUÊNCIAS DE 16S RDNA DE ESTIRPES ISOLADAS DE FEIJOEIRO CLASSIFICADAS DE ACORDO COM OS RESULTADOS DA ANÁLISE DO PROGRAMA CLASSIFIER DO RDPII ([HTTP://RDP.CME.MSU.EDU/](http://rdp.cme.msu.edu/)).



Número de estirpes não classificadas: Bacteria: 5; Rhizobiales: 5; Microbacteriaceae: 1; Sphingomonadaceae: 1; Rhizobiaceae: 2; Alphaproteobacteria: 1; Betaproteobacteria: 1; Gamaproteobacteria: 1.

4.3.3.2 BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST

A pesquisa por similaridade foi realizada no Genbank, pelo BLAST. O programa MegaBLAST, cuja comparação se dá pela pesquisa contra banco de dados de nucleotídeos, foi utilizado para fazer as comparações. Por padrão, a saída do programa MegaBLAST retorna os 50 resultados mais significativos. A opção foi feita pelo retorno de apenas 10 resultados. O valor estatístico E ficou entre 0.0 e 10^{-155} . Para cada uma das estirpes optou-se por mostrar os resultados mais significativos. Os resultados obtidos por esta pesquisa estão resumidos no quadro 5. Quatro estirpes (154,155, 170 e 172) tiveram o fragmento final 3' submetidos para a comparação, e o restante das seqüências, seqüências contíguas e seqüências individuais pertence à região Y1/Y2. Em 8 delas não foi possível obter a seqüência contígua da região inicial Y1/Y2, sendo assim apenas a seqüência correspondente à amplificação de um dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizada, aquela em que a qualidade da seqüência era melhor. De acordo com os resultados obtidos por esta pesquisa, a maior parte dos isolados pertence ao gênero *Rhizobium*. De forma geral, o resultado do BLAST para 26 estirpes (das 48 analisadas) mostraram similaridade com espécies de *Rhizobium*, sendo predominante *Rhizobium tropici* com 12 estirpes consultadas similares a esta espécie. *Rhizobium leguminosarum* aparece na pesquisa por similaridade com 6 estirpes similares. Outras espécies de *Rhizobium* são similares a 8 estirpes isoladas de feijoeiro. O gênero *Ralstonia* aparece logo em seguida com 9 *matches*, dos quais 8 são da espécie *R. picketti*. Das estirpes enviadas para a consulta, 3 têm a seqüência parcial do 16S rDNA similares às do gênero *Burkholderia*, sendo 2 similares à espécie *B. kururiensis*. Estes resultados são bastante similares àqueles descritos na pesquisa do

Ribosomal Database Project (seção 4.5.1), considerando-se a proporção de estirpes não-classificadas no resultado do RDPII. Dados os baixos índices de confiança atingidos pelas estirpes nas quais não houve concordância com os resultados do BLAST quanto à taxonomia, é possível dizer que o resultado das duas buscas coincidem. A estirpe 100, por exemplo, foi classificada como uma Deltaproteobactéria, do gênero *Desulfofustis* pelo RDPII, porém com um limite de confiança de apenas 13% para as Deltaproteobacérias. A homologia detectada pelo BLAST posicionou esta estirpe próxima de *Rhizobium tropici*.

Outros gêneros aparecem representados em menor número. O resultado da pesquisa BLAST para cada uma das estirpes é mostrado no quadro 6.

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.
 TODOS OS ALINHAMENTOS MOSTRADOS NA TERCEIRA COLUNA POSSUEM IGUAIS
 VALORES DE EXPECT, IDENTIDADES E GAPS.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identidades Gaps	Extensão do alinhamento
87	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	5×10^{-133} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
89	Y1/Y2 286	<i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	6×10^{-147} 285/285 (100%) 0/285 (0%)	285/286 (99%)
90	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-131} 259/260 (99%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
91	Y1/Y2 265	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AY851692) <i>Agrobacterium</i> sp. SDW052 (AF508209) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> isolado B8S (AY850392) <i>Rhizobium</i> sp. EGY4 (AY693663) Uncultured <i>Agrobacterium</i> sp. clone CI-49-TB2-I (AY599685)	8×10^{-136} 265/265 (100%) 0/265 (0%)	1-265 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
92	Y1/Y2 360	<i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	1×10^{-139} 287/292 (98%) 0/292 (0%)	291/292 (99%)
94	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853) <i>Ralstonia</i> sp. 13H (AY191852)	2×10^{-151} 293/293 (100%) 0/293 (0%)	292/293 (100%)
98	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-131} 259/260 (99%)0/260 (0%)	260/260 (100%)
100	Y1 768	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium</i> sp. AC100b (AY776212) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	4×10^{-119} 255/265 (96%) 0/265 (0%)	264/768 (34%)

Contiuna

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
101	Y1 691	Uncultured bacterium clone M15 (AY444977) Bacterium PT02 (DQ136047) <i>Caulobacter vibrioides</i> IDCIII6 (AY444977) <i>Caulobacter vibrioides</i> IDCII9 (DQ122195) <i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (AE006011) <i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (AE005930)	1×10^{-73} 236/274 (86%) 12/274 (4%)	267/691 (38%)
102	Y1/Y2 256	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_2 (DQ303303)	3×10^{-130} 256/256 (100%) 0/256 (0%)	256/256 (100%)
104	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	8×10^{-131} 259/260 (99%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
107	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	2×10^{-151} 294/294 (100%) 0/294 (0%)	294/294 (100%)
108	Y1 720	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) Grassland soil clone sl2_521 (AF078381) <i>Rhizobium</i> sp. AC100b (AY776212) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776)	3×10^{-43} 213/245 (86%) 0/260 (0%)	260/720 (36%)
109	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
110	Y1/Y2 261	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	5×10^{-133} 261/261 (100%) 0/261 (0%)	
111	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	2×10^{-151} 294/294 (100%) 0/294 (0%)	294/294 (100%)
114	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
119	Y1/Y2 288	<i>Burkholderia</i> sp. BR3446 (AY773190) <i>Burkholderia</i> sp. BR3407 (AY773186) <i>Burkholderia</i> sp. BR3405 (AY773185) <i>Burkholderia</i> sp. SEMIA 6166 (AY904767)	2×10^{-141} 284/288 (98%) 0/288 (0%)	288/288 (100%)
121	Y2 740	<i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-127} 267/275 (97%) 0/275 (0%)	274/740 (37%)
126	Y1/Y2 260	Uncultured bacterium clone WIT13.9 (DQ202254) <i>Agrobacterium rhizogenes</i> IPV-BO (AY310320) <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (X67232) <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (X67224) <i>Rhizobium</i> sp. TJ172 (AJ505299) <i>Rhizobium</i> sp. TJ171 (AJ505298)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
127	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) <i>Rhizobium leguminosarum</i> 99A1 (AY559497) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304)	8×10^{-131} 259/260 (99%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
130	Y1/Y2 253	Bacterium RBA-1-23 (AY822498) <i>Microbacterium</i> sp. B19 (AB027702)	6×10^{-127} 252/253 (99%) 0/253 (0%)	253/253 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
132	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) <i>Rhizobium leguminosarum</i> 99A1 (AY559497) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
140	Y1/Y2 306	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	3×10^{-145} 298/304 (98%) 5/304 (1%)	304/304 (100%)
149	Y1/Y2 261	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	5×10^{-133} 261/261 (100%) 0/261 (0%)	261/261 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
153	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	2×10^{-151} 294/294 (100%) 0/294 (0%)	294/294 (100%)
154	16S1203f /Y3 205	<i>Rhizobium</i> sp. 1003 (AB054953) Uncultured <i>Ochrobactrum</i> sp. clone p4 (AY851688) Uncultured <i>Ochrobactrum</i> sp. clone p3 (AY851687) <i>Rhizobium</i> sp. lebi-5 (AY490119) <i>Rhizobium</i> sp. lebi-1 (AY490118) <i>Rhizobium</i> sp. lebi-6 (AY490104)	3×10^{-90} 199/206 (96%) 3/206 (1%)	205/205 (100%)
155	16S786f/ 1203f 232	<i>Rhizobium</i> sp. lebi-5 (AY490119) <i>Rhizobium</i> sp. lebia-1 (AY490118) <i>Rhizobium</i> sp. lebi-6 (AY490104) <i>Rhizobium</i> sp. alju-1 (AY490100) <i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 01012 (AY452142) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_2 (DQ303303)	1×10^{-103} 224/232 (96%) 0/232 (0%)	232/232 (100%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
156	Y1/Y2 261	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	5×10^{-133} 261/261 (100%) 0/261 (0%)	261/261 (100%)
157	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	2×10^{-151} 294/294 (100%) 0/294 (0%)	294/294 (100%)
159	Y2 747	<i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ATCC 14480 (AY509900) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ARPV02 (AY196964) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304)	3×10^{-90} 230/253 (90%) 0/253 (0%)	295/747 (39%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
160	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium tropici</i> PRF93 (AY117624) <i>Rhizobium tropici</i> PRF35 (AF260298) <i>Rhizobium tropici</i> PRF54 (AF260275) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6383 (AY904776) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6168 (AY904769) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
161	Y1/Y2 288	<i>Burkholderia kururiensis</i> LUC5 (AY586520) <i>Burkholderia kururiensis</i> LUC24 (AY586518) <i>Burkholderia kururiensis</i> IRP416 (AY586516) <i>Burkholderia kururiensis</i> (AB024310) <i>Burkholderia brasilensis</i> (AJ238360)	4×10^{-148} 288/288 (100%) 0/288 (0%)	288/288 (100%)
164	Y1/Y2 260	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) <i>Rhizobium leguminosarum</i> 99A1 (AY559497) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304)	2×10^{-132} 260/260 (100%) 0/260 (0%)	260/260 (100%)
167	Y2 928	<i>Rhizobium</i> sp. ORS217 (AF514802) <i>Rhizobium</i> sp. ORS3177 (AY864736) <i>Rhizobium</i> sp. JEYF11 (AB069652) <i>Rhizobium leguminosarum</i> DASA23111 (AF417563) <i>Rhizobium leguminosarum</i> DASA23002 (AF417562) <i>Agrobacterium</i> sp. K-Ag-3 (D14504)	6×10^{-132} 274/281 (97%) 1/281 (0%)	279/928 (30%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
170	16S786/ Y3 449	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11542 (AY491059) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae PEPSM13 (DQ196418) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii PEVF01 (DQ196416) <i>Rhizobium</i> sp. Gi7 (AY210715)	0.0 448/449 (99%) 1/449 (0%)	419/449 (93%)
172	16S362/ Y3 1029	<i>Burkholderia kururiensis</i> (AB024310) <i>Burkholderia brasiliensis</i> (BBR238360)	0.0 981/993 (98%) 2/993 (0%)	993/1029 (96%)
173	Y1/Y2 295	<i>Ralstonia pickettii</i> isolado 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	6×10^{-152} 295/295 (100%) 0/295 (0%)	295/295 (100%)
176	Y1/Y2 203	<i>Sinorhizobium</i> sp. PRF129 (AY117664) <i>Rhizobium etli</i> PRF246 (AY117661) <i>Rhizobium</i> sp. SEMIA 6165 (AY904766)	3×10^{-80} 188/198 (94%) 4/198 (2%)	195/203 (96%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
180	Y1/Y2 294	<i>Ralstonia pickettii</i> isolate 6BR8 (AY792023) <i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured bacterium (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853)	2×10^{-151} 294/294 (100%) 0/294 (0%)	294/294 (100%)
189	Y2 832	<i>Uncultured Thauera</i> sp. clone B225FWB8 (DQ125332) <i>Rhizobium indigoferae</i> (DQ129929) Uncultured bacterium clone LCKS10-B10 (DQ129910) Uncultured bacterium clone CCSD_DF2290_B10 (DQ128189) Uncultured bacterium clone CCSD_DF2290_B2 (DQ128184) <i>Rhizobium indigoferae</i> (AY034027)	3×10^{-40} 114/124 (91%) 0/124 (0%)	123/832 (15%)
194	Y1/Y2 294	<i>Sphingomonas</i> sp. oral clone AV069 (AF385529) Uncultured bacterium (AB126358) Uncultured alpha proteobacterium (AB015565) <i>Sphingomonas rhizogenes</i> RSB-1 (AY962684) Uncultured bacterium GKS2-124 (AJ290027) star-like microcolonies (AJ001344)	1×10^{-109} 262/283 (92%) 2/283 (0%)	281/294 (95%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
195	Y1/Y2 261	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AY851692) <i>Agrobacterium</i> sp. SDW052 (AF508209) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> isolado B8S (AY850392) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NCPPB 4042 (AY306228) Uncultured <i>Agrobacterium</i> sp. clone CI-49-TB2-I (AY599685) Rhizobiaceae bacterium Ellin7208 (AY673374)	5×10^{-133} 261/261 (100%) 0/261 (0%)	261/261 (100%)
199	Y1/Y2 220	<i>Rhizobium</i> sp. hpig4.1 (AY691401) <i>Rhizobium tropici</i> PRF233 (AY117622) Uncultured eubacterium clone GL184.11 (AY038615) <i>Rhizobium tropici</i> (AF000617) <i>Rhizobium tropici</i> (AF000616) <i>Rhizobium tropici</i> UPM1152 (AF466174)	3×10^{-110} 220/220 (100%) 0/220 (0%)	220/220 (100%)
200	Y1/Y2 288	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) <i>Rhizobium leguminosarum</i> 99A1 (AY559497) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304)	8×10^{-136} 277/282 (98%) 2/282 (0%)	279/288 (96%)

Continua

QUADRO 6: RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST.

Estirpe	Seqüência Tamanho(pb)	Alinhamentos mais significativos	Expect Identities Gaps	Extensão do alinhamento
204	Y2 769	<i>Ralstonia</i> sp. 4BR1 (AY792009) Uncultured Burkholderiales (AB193942) Uncultured bacterium (AB177316) <i>Ralstonia</i> sp. 14C (AY191854) <i>Ralstonia</i> sp. 13I (AY191853) <i>Ralstonia</i> sp. 13H (AY191852)	9×10^{-155} 306/309 (99%) 0/309 (0%)	308/769 (40%)
206	Y1/Y2 288	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone GAMMA3 (AY494609) <i>Pseudomonas</i> sp. J83 (DQ207731) Uncultured bacterium clone FC113.12 (AY510962) Uncultured bacterium clone FC113.03 (AY510953) Uncultured bacterium clone FC110.30 (AY510890) Uncultured bacterium clone GO111.04 (AY512122)	2×10^{-126} 275/288 (95%) 0/288 (0%)	288/288 (100%)
213	Y1/Y2 256	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 14642 (AY491062) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 12687 (AY491061) <i>Rhizobium leguminosarum</i> ICMP 11727 (AY491060) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone cRI25c (AY364045) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_15 (DQ303304) Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM18_2 (DQ303303)	3×10^{-130} 256/256 (100%) 0/256 (0%)	256/256 (100%)

Na terceira coluna encontram-se as espécies similares às estirpes utilizadas neste trabalho. Entre parênteses estão os números de acesso no Genbank. Todos os resultados para uma mesma estirpe possuem o mesmo Expect, identities e gaps.

4.3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

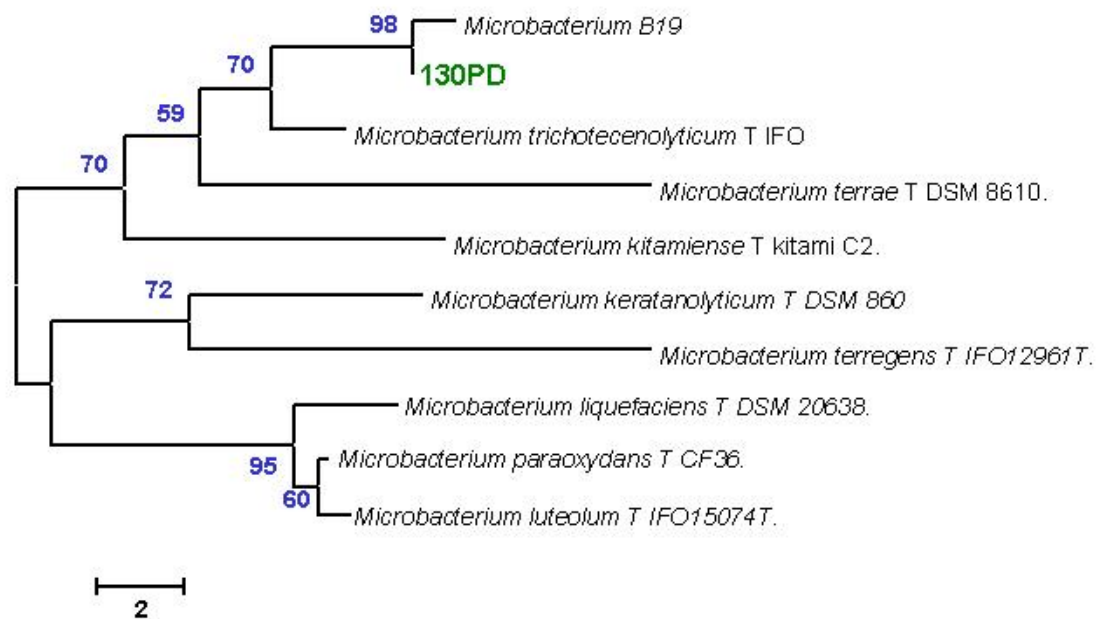
Na análise filogenética pretendeu-se avaliar a proximidade das estirpes utilizadas neste trabalho com outros grupos de bactérias, sendo utilizadas as estirpes tipo de cada um dos grupos e as estirpes que possuíam o maior similaridade com as estirpes isoladas de feijoeiro.

Para a construção das árvores, alinou-se, inicialmente, as seqüência de estirpes Tipo, obtidas no site RDP II, com as seqüências das estirpes deste trabalho. Outras que ficaram próximas às isoladas de nódulos de feijoeiro foram também utilizadas.

Várias das estirpes isoladas de feijoeiro apresentaram seqüências com uma similaridade próxima de 100 %, indicando tratar-se todas da mesma espécie. Para estas estirpes muito similares apenas uma seqüência representativa foi usada para criar um agrupamento e utilizada para a construção das árvores. Para a única estirpe das Actinobactérias, uma árvore foi construída separadamente. Nesta árvore nota-se a proximidade da estirpe 130 com *Microbacterium* B19, isolada de plantas de arroz. As seqüências otidas de *Pseudomonas* do RDP II, apresentaram grande identidade ao fragmento Y1/Y2 do 16S rDNA, o que comprometeu as primeiras construções de árvores, gerando valores de *bootstrap* extremamente baixos, portanto. Deste modo, a seqüência de *Pseudomonas* isolada de feijoeiro teve de ser alinhada com seqüências de bactérias mais distantes filogeneticamente, e a espécie capaz de formar um agrupamento consistente com a estirpe 206 foi *P. fluorescens*. Nesta mesma árvore foi colocada a estirpe isolada 194, que forma um grupo consistente com *S. echinoides*. Na árvore filogenética de *Rhizobium*, as estirpes 199 e 126 não possuem semelhantes entre as outras estirpes isoladas, formando grupos com *R. tropici* e *R. rhizogenes*, respectivamente. O agrupamento denominado II, que possui 10 seqüências idênticas

(87, 90, 98, 104, 109, 110, 114, 149, 156 e 160), ficaram bastante próximos da estirpe *Rhizobium* SEMIA 6383, e um pouco mais distante está o grupo I (102, 127, 132, 164, 213), mas também está integrando este grupo . Próximo de *Agrobacterium tumefaciens* esta o grupo III, que possui as estirpes 91 e 195. Finalmente, na última árvore filogenética mostrada estão reunidas as espécies similares a *Ralstonia* e *Burkholderia*. O grupo IV (107; 111; 173; 153; 157; 180), com as estirpes 140 e 94 estão muito próximas a *R. insidiosa*. *Burkholderia* sp. forma um grupo com a estirpe 119 e *B. kururiensis* está próxima da estirpe 161.

FIGURA 6: ÁRVORE MOSTRANDO A RELAÇÃO FILOGENÉTICA DA ESTIRPE 130 COM ESPÉCIES PRÓXIMAS DE *Microbacterium*



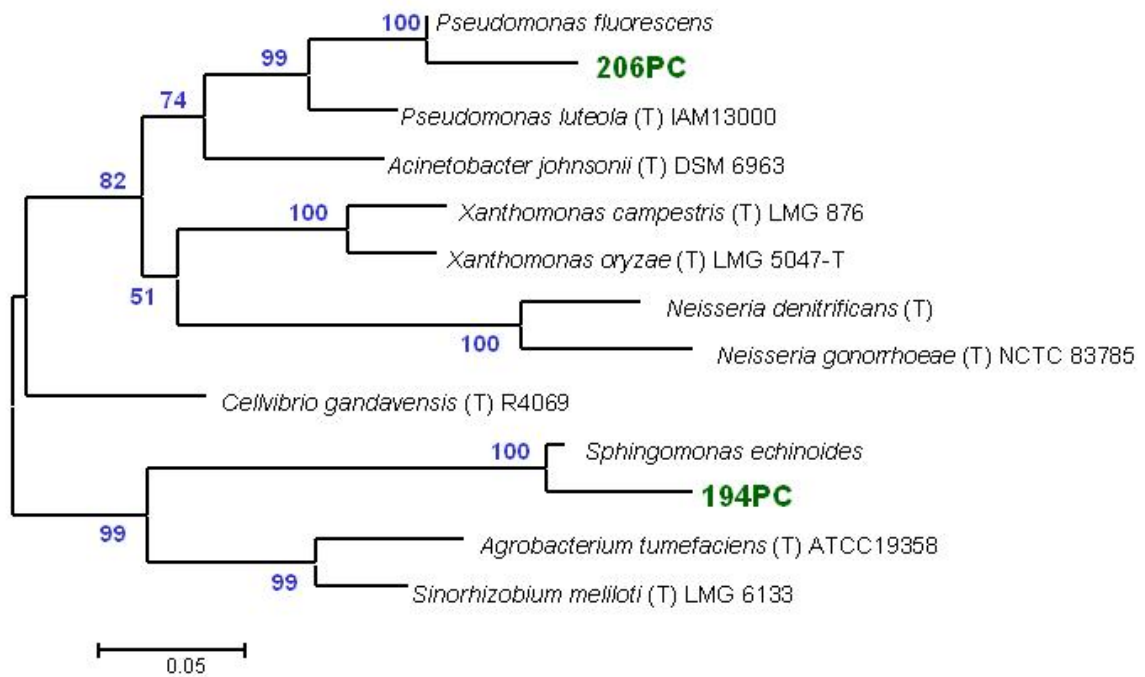
Método: Neighbour-joining

Distância: número de diferenças de nucleotídeos

1000 amostras bootstrap

Ao lado do nome da estirpe 130 está indicado o sistema de manejo do local onde ela foi isolada, neste caso o plantio direto.

FIGURA 7: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Pseudomonas* E *Sphingomonas*



Método: Neighbour-joining

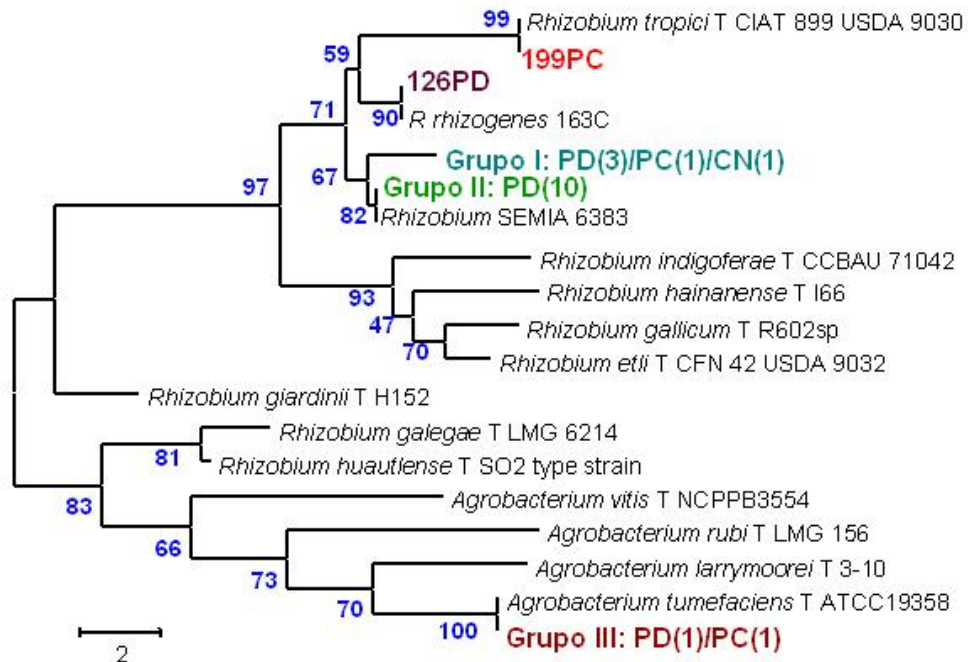
Distância: número de diferenças de nucleotídeos

1000 amostras bootstrap

206PC: estirpe 206 isolada de nódulo feijoeiro. Sistema de manejo: plantio convencional

194PC: estirpe 194. Plantio convencional

FIGURA 8: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS



Método: Neighbour-joining

Distância: número de diferenças de nucleotídeos

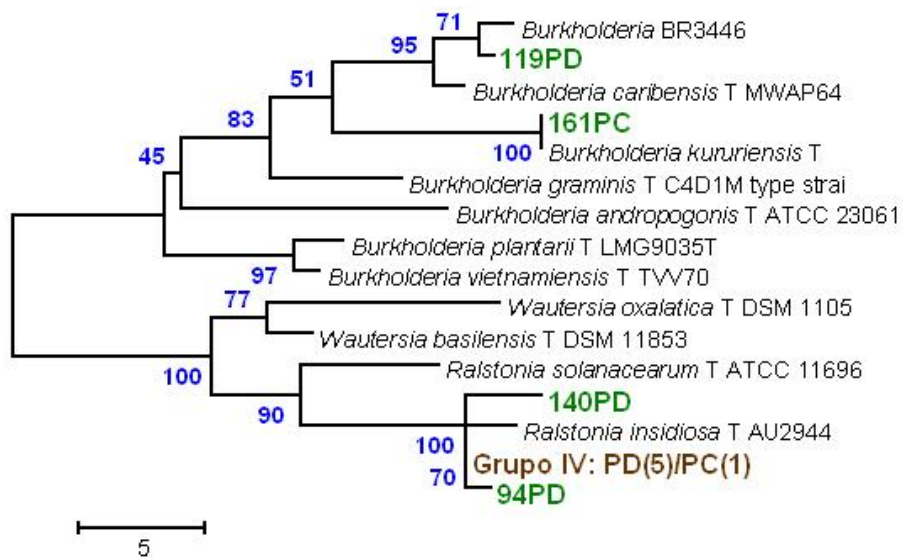
1000 amostras bootstrap

Grupo I: estirpes 102, 127, 132 de plantio direto. Estirpe 164 de plantio convencional e 213 de campo nativo.

Grupo II: 87, 89, 90, 92, 98, 104, 109, 110, 114, 149, 156, 160, todas as estirpes são provenientes do sistema de plantio direto.

Grupo III: 91 de plantio direto e 195 de plantio convencional. Árvore filogenética de *Rhizobium* e *Agrobacterium*

FIGURA 9: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Ralstonia* E *Burkholderia*



Método: Neighbour-joining

Distância: número de diferenças de nucleotídeos

1000 amostras bootstrap

Grupo IV: 107, 111, 173, 153 e 157 de plantio direto. Estirpe 180 de plantio convencional

5 DISCUSSÃO

O feijoeiro é uma planta considerada promíscua, dada a grande quantidade de espécies de bactérias que são capazes de estabelecer simbiose nos nódulos das raízes desta planta, entre elas várias espécies de *Rhizobium* (*R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. giardinii*) e outras que pertencem aos gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (VELÁZQUEZ et al, 2001). O que pode explicar, pelo menos em parte, o grande número de gêneros encontrados, por análise de sequenciamento, neste trabalho.

Estas estirpes isoladas foram inicialmente analisadas por métodos morfológicos (morfologia da colônia) e morfogenéticos por BOXA1-PCR e RFLP do 16SrDNA. A diversidade de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro, usado como planta isca em solos oriundos de três diferentes sistemas de plantio em Campo Belo do Sul (SC) foi bastante alta, como indicaram os índices de diversidade, riqueza genética e equidade utilizados por aqueles autores. Foram caracterizadas 80 estirpes a partir de solo sob plantio direto (PD), 46 estirpes a partir de solo sob plantio convencional (PC) e 20 estirpes a partir de solo de campo nativo (CN). Trinta e seis estirpes de PD e PC foram agrupadas com base no perfil de amplificação com BOX A1R-PCR em 9 e 6 grupos, respectivamente. Não houve identidade total com nenhuma das estirpes isoladas e as bactérias utilizadas como padrão. Estes resultados obtidos inicialmente demonstram a incapacidade de classificação de métodos como estes que envolvam caracterizações morfológicas ou morfogenéticas (KASCHUK et al, 2005). O plantio direto está diretamente ligado ao aumento na diversidade microbiana (FAO, 2004).

Para as comparações das seqüências em bancos de dados optou-se por utilizar o Genbank, cuja comparação é feita pelo programa BLAST e o RDPII, que

classifica as seqüências probabilisticamente com base em padrões de seqüências depositadas no banco de dados. Nos resultados obtidos pelas duas comparações houve concordância de dados no grupo de *Rhizobium*, sendo possível identificar estes gêneros isolados de nódulos de feijão com grande precisão, de acordo com os parâmetros de cada programa.

Os resultados obtidos pelas análises das seqüências mostraram que há uma grande diversidade de gêneros bacterianos, muito maior do que a inicialmente proposta, onde havia a suposição de que todos os isolados pertencessem ao grupo de gêneros conhecido coletivamente como rizóbios. Tal diversidade intrigou inicialmente, pois havia a presença de bactérias bastante incomuns no nódulo, como a estirpe 130, uma actinobactéria do gênero *Microbacterium*. A microbactéria mais próxima à estirpe 130, isolada de nódulo de feijão, a partir de solo de plantio direto, foi a *Microbacterium* B19, inicialmente isolada de plantas de arroz como uma bactéria endofítica (ELBELTAGY et al, 2000). A estirpe 206 de plantio convencional, pertencente ao gênero *Pseudomonas* pode sugerir um tipo de infecção que não seja simbiótica, pois este gênero contém representantes patógenos de plantas. Existem muitos representantes destes patógenos divididos em vários patovares (GARDAN et al, 1999). Do mesmo modo não é possível concluir se a presença de *Ralstonia* e *Burkholderia* é uma simbiose ou uma infecção que pode ser potencialmente prejudicial. Dentro do gênero *Burkholderia*, por exemplo, ocorrem tanto espécies benéficas, capazes de fixar nitrogênio ou produzir fitormônios como AIA (ácido indol acético), como a *B. tropica* (REIS, 2004) e outras espécies (MOULIN et al, 2001; CHEN et al, 2003), quanto espécies patogênicas, tanto de plantas quanto de animais, como a *B. cepacia*, originalmente conhecida como agente causador do apodrecimento de cebolas e posteriormente encontrada em pacientes com fibrose cística, juntamente com outras espécies recentemente descritas, como *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B.*

vietnamiensis e *B. ambifaria* (CYSTIC FIBROSIS WORLDWIDE WEBSITE, 2006). O gênero *Ralstonia* da mesma forma possui espécies que são capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação com leguminosas (CHEN et al, 2001; CHEN et al, 2003) como representantes capazes de infectar mais de 200 espécies de plantas e de trazer grandes perdas a plantações em áreas tropicais e subtropicais (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/ralsto/>).

Há uma diversidade de bactérias semelhante no sistema de plantio direto e plantio convencional. No plantio convencional encontrou-se uma grande diversidade de gêneros como *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Ralstonia* e *Burkholderia*. As estirpes 194 e 199 são consideradas similares (mais de 50%) no trabalho anterior, pertencentes ao Grupo 1 de BOX A1-PCR, mas com uma distância genética de cerca de 50%, foram identificadas como *Sinorhizobium echinoides* e *Rhizobium tropici*, respectivamente, por análise das seqüências. A estirpe 206, do Grupo 2 de BOX A1R-PCR, foi identificada como *Pseudomonas fluorescens*. Alguns Grupos BOX A1R-PCR, não foram confirmados por dados de seqüenciamento. A estirpe 161, considerada próxima à estirpe usada como referência *Rhizobium etli* CFN42 (cerca de 50 % de similaridade), foi identificada como *Burkholderia* por seqüenciamento. Três estirpes, 167, 170 e 172, pertencentes ao mesmo grupo de estirpes referência de *Rhizobium tropici* na análise de BOX A1R-PCR, foram identificadas como *Rhizobium leguminosarum* e *Burkholderia kururiensis*. Vale ressaltar que as estirpes identificadas como *R. leguminosarum* (167 e 170), mostraram um perfil BOX A1R-PCR cerca de 60% semelhante, enquanto as estirpes 170 e 172, por BOX A1R-PCR foram agrupadas com mais de 80% de similaridade, mas tratam-se de *R. leguminosarum* e *B. kururiensis*, segundo análise da seqüência com o programa BLAST. A estirpe 176 foi identificada como *Rhizobium etli* por seqüenciamento, mas foi colocada em um grupo bastante distinto daquele formado a partir de estirpe CFN42 de *R. etli*, usada como

referência na análise de BOX A1R-PCR. Outras discordâncias foram ainda observadas. A estirpe 200 mostrou-se muito distante da estirpe 170 na análise de BOX A1R-PCR, mas ambas foram identificadas como *Rhizobium leguminosarum* por seqüenciamento.

Quanto ao sistema de manejo do tipo plantio direto, houve similaridade de um grande número de estirpes com rizóbios das estirpes SEMIA e PRF, utilizados como inoculantes comerciais. A presença destes rizóbios neste local pode sugerir a utilização destas estirpes nas plantações de feijão e a quantidade destas estirpes encontradas em sistema plantio direto revela uma estabilização destas populações neste local. No trabalho anterior, a estirpe 130, uma microbactéria, e a estirpe 127, *R. leguminosarum*, são 90% similares segundo análise de BOX A1-PCR. Uma situação idêntica agrupou as estirpes 160 e 157 com mais de 90% de similaridade por BOX A1, sendo que a primeira é *R. tropici* e a segunda, *Ralstonia picketti*, como revelou a análise das seqüências. A análise de BOX A1-PCR também não foi capaz de distinguir a diversidade intra-gênero, pois formou-se um grupo próximo, entre 50 e 60 % de similaridade, as estirpes de referência *R. giardinii* H152, *R. etli* CFN42 e a estirpe 155, *R. leguminosarum*. Uma situação semelhante reuniu as estirpes 126 e 140, *Agrobacterium rhizogenes* e *R. picketti* (dados de seqüência), com mais de 60% de similaridade. Notou-se a quantidade muito menor de estirpes pertencentes ao gênero *Rhizobium* quando comparada ao sistema de plantio direto.

Analisando estes resultados observou-se uma diferença entre as abordagens inicialmente empregadas, testes morfológicos e morfogenéticos, e a abordagem molecular por seqüenciamento empregada nesta dissertação. É possível separar dois grupos de bactérias previamente identificadas e classificadas por métodos tais como ERIC-PCR, RFLP-PCR e ribotipagem, (SHANGKUAN et al, 2000), pois o objetivo deste artigo foi separar estirpes *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*, sendo que os

autores comentam que a combinação destes tres métodos possibilitou alta resolução na distinção destes grupos.

VAN PELT et al, (1999) fazem comparação de diversos tipos de abordagens experimentais para identificação de estirpes de *Burkholderia*, um grupo de particular interesse comercial, pois há um potencial uso deste gênero como biopesticidas, promotores de crescimento em plantas e degradantes de poluentes ambientais. Quanto a meios seletivos, estes autores comentam que estirpes de *B. cepacia* não pode ser identificada com base em meio específico, pois outras bactérias além desta pode crescer neste meio, portanto esta metodologia deve ser utilizada apenas como uma primeira abordagem e não como identificação definitiva. A conclusão a que estes autores chegam é de que não há uma abordagem definitiva (international gold standard) para a identificação laboratorial, sendo o PCR-RFLP considerada como a melhor técnica.

AVROVA et al (2002), utilizando o método AFLP foram capazes de resolver a classificação de *Erwinia* sp. Intraespecificamente, sendo capaz de discriminar entre estirpes próximas. Estes autores argumentam que compreender a diversidade e as relações entre taxa patogênicos é um importante pré-requisito para classificação taxonômica, identificação precisa, detecção de patógenos e estudos de epidemiologia. Este método não foi capaz de estabelecer relações interespecíficas entre taxa mais distantemente relacionados de *Erwinia* sp.

A pouca confiança em kits comerciais para ensaios bioquímicos, como API20NE, para identificação de bactérias é discutida e confrontada com métodos moleculares como PCR e hibridização (WELLINGHAUSEN et al, 2005). O objetivo deste estudo foi identificar espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* em amostras recuperadas de pacientes com fibrose cística. A sensibilidade do método real time-PCR foi de 98,1% contra 84% do API20NE considerada como “muito boa

identificação”.

6 CONCLUSÕES

A diversidade presente nos nódulos de feijoeiro é devido à presença de muitos gêneros, além dos gêneros que incluem rizóbios. Pelo sequenciamento e análise do 16S rDNA houve a confirmação da presença de gêneros incomuns nos nódulos de feijoeiro, tais como *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Microbacterium*.

Os dados obtidos por sequenciamento não refletem aqueles inicialmente proposto por Kaschuk et al, 2005, através de análises de BOX A1-PCR e análises de RFLP. Estirpes bacterianas que foram consideradas rizóbios próximos, pela análise de sequência do 16S rDNA, constatou-se que se tratam de organismos muito distantes.

Do plantio direto, 32 sequências de estirpes puderam ser analisadas, 15 sequências de estirpes do plantio convencional e 1 sequência de campo nativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AON, M.A.; SARENA, D.E.; BURGOS, J.L.; CORTASSA, S. (Micro)biological, chemical and physical properties of soils subjected to conventional or no-till management: an assessment of their quality status. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v.60, p.173-186, 2001.

AVROVA, A. O.; HYMAN L. J.; TOTH, R. L. E TOTH, I.K. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of the Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1499–1508. 2002.

BAKER, C.J.; SAXTON, K.E.; RITCHIE, W.R. **No-tillage seedling**. Science and practice, Cambridge: University Press, 1996.

BERGENSEN, F. J. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. **J. Biol. Sci.**, Aust, v. 14, p349-360. 1961.

BEIJERINCK M. W.; van DELDEN A. Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. **Centralbl Bakt Abt. II**9:3–43. 1902

BINGEN, E.H.; DENAMUR, E.; ELION, J. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clinical Microbiology Reviews**. 7: 311-327.

BIOEDIT

< <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html> > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento Bactérias podem aumentar a produção de feijão em áreas secas do nordeste

< <http://www.biotecnologia.com.br/bionoticias/noticia.asp?id=323> > Acesso em 03 de Março de 2006

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a ed, New York, Springer-Verlag, 2001.

BÖTTGER, E. C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 65, p. 171-176, 1989.

British Petroleum, 1996. BP Statistical Review of World Energy. **British Petroleum**, London. 1996.

BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; NOLLER, H. F.; Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 148, 107-127, 1981.

CHEN, W.M., MOULIN L., BONTEMPS C., VANDAMME P., BENA G. e Boivin-Masson C. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266–7272. 2003.

CHEN W. M.; LAEVEN S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS P.; MAX MERGEAY M. e VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, 1729–1735. 2001

CLARK, F.E. **Soil microorganisms and plant roots**. Advances in Agronomy, v.1, p.241-288, 1949.

COENYE T., GEVERS D., Van de PEER Y., VANDAMME P., SWINGS J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, 147–167. 2005

CAP3 SEQUENCE ASSEMBLY PROGRAM

< <http://genome.cs.mtu.edu/cap/cap3.html> > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

CLASSIFIER :: HELP

< http://rdp.cme.msu.edu/classifier/class_help.jsp#model > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

CLUSTALW

< <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

CONSED--A GRAPHICAL TOOL FOR EDITING PHRAP ASSEMBLIES

< <http://bozeman.mbt.washington.edu/consed/consed.html> > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG Q.; KULAM, S.A.; McGARRELL, D.M.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 294-296. 2005.

COWAN, S.T.. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh, Oliver & Boyd, 1968.

CRUZ, L. M. **Caracterização e Análise Filogenética Molecular de Novos Isolados Fixadores de Nitrogênio**. Curitiba, 2001. 171p. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Cultivo do Feijoeiro Comum. Straliootto, R.; Teixeira, M.G. e Mercante, F.M.

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm>> Acesso em 03 de Março de 2006.

DE SMEDT, J.; BAUWENS, M.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Intra- and intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of free-living, nitrogen-fixing bacteria. **Int. Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 30, p. 106-122, 1980.

DYKHUIZEN, D. E.; GREEN, L. J. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 7257-7268. 1991.

EADY, R. R. The Dinitrogen-Fixing Bacteria. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; WORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The Prokariotes**. New York,. Springer-Verlag. p. 534-553, 1991.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, T.; SATO, Y.; MORISAKI, H.; MISTUI, H. e MINAMISAWA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionaly cultivated rice varieties. **Soil Sci Plant Nutr**, v. 46, 617-629. 2000.

EVERS, G.; AGOSTINI, A. No-tillage farming for sustainable land management: lessons from the 2000 Brazil study tour. **FAO Soil Fertility Iniciative**, Rome, TCI Occasional paper series 12. 2001.

EWING B., HILLIER L., WENDL M. C. e GREEN P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FITCH, W. M. Distinguishing homologous from analogous proteins. **Systematic Zoology**, v. 19, p.99–110. 1970.

FAO (Food and Agriculture Organization) What is Conservation Agriculture? Disponível em:

< http://www.fao.org/ag/AGS/AGSE/agse_e/1ero/INT1.htm.> Acesso em: 28 Mar 2004.

FOX, G. E. The structure and evolution of archaebacterial ribosomal RNA.. In: WOESE C.R. e WOLFE R.S. **The bacteria**. New York: Academic Press, 1985. p. 257-310.

FOX, G.E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R.B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T.A.; WOLFE, R.S.; BALCH, W.E.; TANNER, R.S.; MAGRUN, L.J.; ZABLEN, L.B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B.J.; STAHL, D.A.; LUEHRSEN, K.R.; CHEN, K.N.; WOESE, C.R. The phylogeny of prokaryotes. **Science**, Washington, v. 209, p. 457-463, 1980.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. Root-nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. 1932.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCK, A.; BROUCHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular Basis of Symbiosis Between *Rhizobium* and Legumes. **Nature**, v 387. p. 394-401. 1997.

FREY, S.D.; ELLIOT, E.T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.31, p.933-935, 1999.

GARDAN, L.; SHAFIK, H.; BELOUIN, S.; BROCH, R.; GRIMONT F. E GRIMONT P. A. D. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 469–478, 1999

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition.** New York: Springer-Verlag. Mai 2004.

GOLDMAN, N. Phylogenetic estimation. IN: BISHOP, M. J.; RAWLINGS, C. J. (eds). **DNA and protein sequence analysis – a practical approach.** New York: IRL press, 1997. p279-312

GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V.; BAKER C.J.; MURRAY B.E. Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1430-1434, 1993.

GORDON D., ABAJIAN C., GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202. 1998.

GORDON S. A. e WEBER R. P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Brief Papers**, p. 192-195. 1950.

GRIMON, F. GRIMONT, P. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as possible taxonomic tools. **Ann. Institute Pasteur/Microbiology**, Paris, v. 137B, p. 165-175, 1986.

GÜRTLER, V.; WILSON, A.V.; MAYALL, B. C. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**. 137: 2673-2679. 1991.

HENZ, S.R., HUSON, D.H., AUCH, A.F., NIESELT-STRUWE, K. E SCHUSTER, S.C. Whole-genome prokaryotic phylogeny. **Bioinformatics**, v. 21, n. 10, p. 2329-2335, 2004.

HILLS, D. M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.; **Molecular systematics.** Second Edition. Sunderland, MA, U.S.A. Sinauer Associates. 1996.

HOUSE, C.H. E FITZ-GIBBON, S.T. Using homolog groups to create a whole-genomic tree of free-living organisms: an update. **Journal of Molecular Evolution**. V. 54, p. 539–547. 2002

HUANG, X. e MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877. 1999.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., **Biologia dos solos dos cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. P. 189-294.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151–164, 2000.

HUYNEN, M.A. e BORK, P. Measuring genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 5849–5856. 1998.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLPTM as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**. In press.

JORDAN, D. C. Rhizobium. In: KRIEG, N. R. e HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 235-242.

JORDAN, D. C.; ALLEN, O. N. Genus I Rhizobium. In: BUCHMAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974. p 262-264.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KYOKAWA, C. KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v.7, p. 331-338. 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **DNA Research**, v. 9, p. 189-197. 2002.

KARLIN, S.; WINSTOCK, G.M.; BRENDDEL, V. Bacterial classifications derived from recA protein sequence comparisons. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 23, p. 6881-6893, 1995.

KASCHUK, G. **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo**. Londrina, 2003. 79p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina.

KASCHUK, G; HUNGRIA, M; SANTOS J. P. C.; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and tillage Research**. In Press, Corrected Proof, Available online 10 May 2005.

KIRCHHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Bethesda, Maryland, U.S.A. v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLADIVKO, E. J. Tillage systems and soil ecology. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v.61, p.61-76, 2001.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 1219-1232, 1992.

KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.L.; STULL, T.L. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2084-2087, 1992.

KUYKENDALL, L.D.; Ç YOUNG, J.M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus Rhizobium. In: Garrity, G. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**, 2ª ed. VOL 2. M. Springer-Verlag, New York, 2003.

KUMAR S., TAMURA K. e NEI M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163. 2004.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. **American Society for Microbiology News**, Washington, v. 65, n. 11, p. 752-757, 1999.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, p. 549-553, 1991.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H. J.; STICKEL, S.; SOGIN, M. L. The characterisation of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, Amsterdam, v. 71, p. 491-499, 1988.

MEGA – MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS

< <http://www.megasoftware.net/>> Acesso em: 01 de janeiro de 2006.

MOULIN L.; MUNIVE A.; DREYFUS B. E BOIVIN-MASSON C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950. 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- MEGABLAST

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- TAXONOMY

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>> Acesso em 16 de fevereiro de 2006

NEWSLETTER – EDITION 3. CYSTIC FIBROSIS WORDWIDE WEBSITE.

<<http://www.cfww.org/index.asp>> Acesso em: 01 de janeiro de 2006.

NEWTON, W. E. N. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

NEWTON, W. E. N. **Encyclopedia of Chemical technology**, 4^a ed. VOL 17, p 172-204, John Wiley & Sons, Inc. New York. 1996.

OLIVE, G.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 337-365, 1986.

PHRED, PHRAP, CONSED

< <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>> Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

PHRAP DOCUMENTATION

< <http://www.phrap.org/phredphrap/phrap.html> > Acesso em: 05 de janeiro de 2006.

QU, L.; MICHOT, B. BACHELLERIE, J.P. Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid “heterologous” sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5’ terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 5903-5919. 1983.

Ralstonia solanacearum Strain GMI1000. Disponível em:

< <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/ralsto/> > Acesso em 13 de Março, 2006

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO S.; VOGEL J.; STOFFELS M.; GUYON S.; MAVINGUI P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID M.; BALDANI J. I.; BALANDREAU J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO J.: *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 54, p. 2155-2162. 2004.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B. e MARTÍNEZ-MOLINA, E. A New Species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11. p. 5217-5222, 2002.

SQUARTINI, A.; STRUFFI, P.; DORING, H.; SELENSKA-POBELL, S.; TOLA, E.; GIACIMINI, A.; VENDRAMINI, E.; VELAZQUEZ, E.; MATEOS, P.F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; DAZZO, F. B.; CASELLA, S.; NUTI, M. P. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly “*Rhizobium hedizary*”), the root-nodule microsymbiont of *Hedizarum coronarium* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1267-1276, 2002.

SAWADA, H.; KWYKENDALL, L.D.; YOUNG, J. M.; Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-491, 1988.

Shangkuan, Y. H., Yang, J. F., Lin H. C. e Shaio, M. F. Comparison of PCR±RFLP, ribotyping and ERIC±PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, n. 89, p. 452-462, 2000.

SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. **The Rhizobiaceae**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1998.

STACKENBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849. 1994.

STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G.M., GRIMONT, P.A., KAMPFER, P., MAIDEN, M.C., NESME, X., ROSSELLO-MORA, R., SWINGS, J.,

TRUPER, H.G., VAUTERIN, L., WARD, A.C. e WHITMAN, W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**. 52, 1043–1047. 2002

STALEY, J.T.; KRIEG, N.J. Classification of prokaryotes organisms: an overview. In: KRIEG, N.R. e HOLT, J. G. **Bergey's manual of systemaic bacteriology**, vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1984.

STURTZ A.V., CHRISTIE B.R., MATHESO B.G., NOWAK J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonized clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 13-19. 1997

SUBBA RAO, N. S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 863-866, 1983.

SY A., GIRAUD E., JOURAND P., GARCIA N., WILLEMS A, DE LAJUDIE P., PRIN Y., NEYRA M., GILLIS M.,BOIVIN-MASSON C.e DREYFUS B.Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214–220. 2001

TAN, Z. Y.; KAN, F. L.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W. X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov. isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 909-914. 2001.

TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, n. 1, p. 49-55, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRUJILLO M. E.; WILLENS A.; ABRIL A.; PLANCHUELO A. M., RIVAS R.,Dolores LUDENA D., MATEOS P. F.; MARTINEZ-MOLINA E. e VELAZQUEZ E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1318–1327. 2005.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen-fixation to sugar-cane-N-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. e IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiololgy**. V. 53 1979-1983. 2003.

VALVERDE A.; VELÁZQUEZ E.; FERNÁNDEZ-SANTOS F., VIZCAÍNO N.; RIVAS R.; MATEOS P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA E., IGUAL J. M. E WILLEMS A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1985-1989.2005.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B.D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiology Reviews**, Washinton, v.60, n.2, p. 407-437.

VARGAS, M. A. T. ; HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997.

VAN PELT, C; VERDUIN, C. M.; GOESSENS, W. H. F.; VOS, M. C.; TUMMLER, B.; SEGONDS, C.; REUBSAET, F.; VERBRUGH, H. e ALEX VAN BELKUM. Identification of *Burkholderia* spp. in the Clinical Microbiology Laboratory: Comparison of Conventional and Molecular Methods **Journal of Clinical Microbiology**, n. 7, v. 37, p. 2158–2164, 1999.

VELÁZQUEZ, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; TRUJILLO, M. E.; DAZA, A.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. e VAN BERKUM, P. Characterization of Rhizobial Isolates of *Phaseolus vulgaris* by Staircase Electrophoresis of Low-Molecular-Weight RNA, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 1008–1010, 2001.

VELAZQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. Rhizobium Inoculation of Phaseolus Vulgaris in Lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**. Rio Pedras, v. 72, p. 427-436. 1988.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6923-6831, 1991.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Rootnodule Bacteria**. Oxford: Blackwell. 1970.

WEI, G. H.; WANG, E. T.; TAN, Z. Y.; ZHU, M. E.; CHEN, W. X. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov. respectively isolated from *Indigofera* spp *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 2231-2239. 2002

YOUNG, J. P. W. Taxonomy and Evolution of Diazotrophs. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000.

YOUNG, J. P. W. Molecular evolution in Diazotrophs: do Genes Agree? In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Agrobacterium undicola* de Lajudice et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **Internacional Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89-103. 2001.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, v. 133, n. 1, p. 87-94. 1996.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p 2271-2277. 1991.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKENBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRÜPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

WILSON, A. C.; CARLSON, S. S.; WHITE, T. J. Biochemical evolution. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 573-639, 1977.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p 221-271, 1987.

WOLF, Y.I.; ROGOZIN, I.B.; KONDRASHOV, A.S. e KOONIN, E.V. Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. **Genome Research**, v. 11, p. 356-372, 2001.

ZABEAN, M.; VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting, European Patent Office, publication 0534858 A1. 1993.

ZHANG, Z; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7(1-2), p. 203-14, 2000.

ZHU, H.; BILGIN, M. e SNYDER, M. Proteomics, Annual Reviews Biochemistry, v. 72, p. 783-812, 2003.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L.. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v. 8, p. 357-366, 1965.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Formato de arquivo Fasta.

Um arquivo em formato fasta pode conter uma ou várias seqüências. Uma seqüência em formato Fasta começa com um sinal de maior “>”, sempre na primeira coluna, seguido de uma breve descrição que deve estar contida em apenas uma linha. No apêndice B todas as seqüências estão neste formato.

APÊNDICE B – Seqüências contíguas.

As seqüências mostradas abaixo são as seqüências contíguas obtidas nas montagens com os programas PHRED/PHRAP ou CAP3/CONSED eeditadas, usadas nas análises de identificação e filogenia dos isolados de nódulos de feijoeiro.

```
>87.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCCCTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAA

>89.fasta.screen.ace
TTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGG
GGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCCTTTACTACGGAATAACGCAGG
GAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAG
CCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

>90.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCCCTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAA

>91.fasta.screen.ace
GCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGT
AACGCGTGGGAACATACCCCTTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAACTGGAATTAATACCGC
ATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
```



```

>92.fasta.screen.ace
TCTTGTGGGGGGGGGGGGGGTTCGTGCGGTGGTGATGGTTGTGTCGTATGGGTGGGAGAGG
CTTGAGGTTTTGATTTTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTC
GAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCCTTTACT
ACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTA
TCGGTAAAGGATGAGCCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC
GACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCCCCCCCATTGGGACTGAGACACGGCCCAA

>94.fasta.screen.ace
ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
TAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAA

>98.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCCCTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGGCCAA

>100_10335_y1.abi
cggtcgtgtggcttnatcagcgnctcgacgtgagacacgatcgcgccgcaaggggagcgg
cagacgggtgantaacgcgtgggaatctaccctttactacggaataacgcagggaaactt
gtgctaataaccgcatgtgtccttcgggagaaagatttatcggtaaaggatgaacccgcgt
tggattacctacttgggtggggtaaaggcctaccaaggcgacgatccatagctggctgag
aggatgatcagccacattgggactgagacacggcccacactcctacgggaggtaccagtg
ggagccccctctcccgccccacctacacaccagaacaccaacccacagatcatccccctc
cacctactcaagccactatccacaacacatcacaataccccccacaccccccaatcac
atcctccacaaacccccacccccctcaccacccattcccccccatccccccacc
acacaccccccccccgacatctccacccatcatacaaccgccatccatcatcctcaaac
acctcaccacgcacccctcctaaacccctctcctcaaacttccccccctccacatcccaa
aacccccaaatcccccccatctgacatcctccggaatcacttccctccatctcattaacca
ctccatcactcactccatacatccaactactgacccctccacgcaaaatacacatcaccat
ctagcccaatccactctcaccacacatctcaacaattctagagatgacc

>101_10397_y1.abi
ccagcttatgatcataagacacgaacggatccctcgggattagtggcgacgggtgaata
acacgtgggaacgtgcccttctgggtcgaacaactcagggaaacttgatctaataccgga
tgtgcccttcgcgggacatatctatcgacattgtgactcgccgtgtctgattatccattt
ggatgatgtaaacgctcaccaacgagaacatctgtatgtggtccttagaagaagatccacca
cattgggagtgacacaacgccccaaacccctaagggaaggccgagtgggggccacatcct
ctcctattcccccaaccaccaacctcacaccactcctctccactcaacacatttcccacta
ccctatcatthaatccctctcacaatccacccaatctccccctctaaccacacacctcaat
ctctatttactccactccatacaatcttaccatcctaccaccactccccctctcactca
tatctcctcacctacaacccctctccatacaacgctcatatcaacacacctccactacca
cacctcttccttctacatcactcccaggaagtctatcaattgagagaagagggaggnnn
aaacaaaacaaaanaggggngggggtgggcttgcggtcgtcacaagttctaagacatccg
agaatgggtcgaggtacaccaagatacttt

>102.fasta.screen.ace
TTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAATCTACCCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCT
TCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCAA

>104.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCCCTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG

```

```

TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGGCCAA
>107.fasta.screen.ace
ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
TAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

>108_10413_y1.abi
tcacggcgggggaccttaaacgcctcaatgagcagcatcgccccgcaatgggatcgggcaa
acgggtgaataacgcctggcaatctccctttatacggactaaccatggaattttgtgcta
taccggatgtgtcctcgggagaaagatttttcgtaaaggatgagcccgcttggattaac
tcataggtggggtaaaggcctacccaagcgaccatccatatctggtctgaaaggatgatc
aaccaccttgggactgacacacggccccccactcctactggcgtgcacccctgggggggac
ctcttcactcctctacccagctctcaccactcccacctcccacactacccccactcct
acccttctctacgccccctctccctaaccctactcccctcataccccccaatctcccc
ttaaaacctcatccaccacctccctccgtccccccgcacctctccacacttcatccac
caccatacaatcaaccctcctcctcttcaccgcccgaaccactccccaccctccataacc
ctcttccccccaatctccctctatcacctaaaccacatcatccactctcctaccacc
ccaacctacacctaccactcacccacacacccaccccccaaactctacactcctccaca
accatccacatcaccatttcnttcttctcccccccaactaacaccacactctctccta

>109.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCCAA

>110.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCCAA

>111
ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
TAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGacacggccag

>114.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCCAA

>119.fasta.screen.ace
ATGCCTTACACATGCAAGTCGGACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGAT
TAATACCGCATACGCTCGGGAGAGGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTCAAGGGG
CGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAG
CTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

>121_10728_y2.abi
ccttgactgtccccagctctcagttccgatgcaactgatcatcctctcagaccagctatgg
atcgctgccttggtaggcctttacccaccaactagctaataccaacgcggtcctatcctt
taccgataaatctttctcccgaaggacacatacggatttagcacaagtttccctgcgtta

```

ttccgtagtaaagggtagattcccacgcgttactcaccgcgtctgccgctcaccttgcggg
gcgctcgaattgcatgtgttagcctgccgccagcgttcgttctgagccaaaatacaaaa
ccacactcccaaaactcaactcccactctccatataacccatcacctcccacaccccc
acccaataccttacacacatccacccccactccaacctccaaagaaataccatcctccc
cccgaacacccactcctccaacacaccacccccaaacatctccccacgcctcacccacc
aacctcactcactccactccgcaacaactccccactccacacccaacatgcctccaatc
ccacccctccgcaaccacaccatcccacacccaacccccacatcaaacacccttccactacc
gaagactaaactccatcactctataccctcaaccccaacccaatcccacgtccaactctc
ccctcacaatctcaacacccacccaaaatagacacaatcctcacttccctcatcaaccac
cgtcccaactccacacaaca

>126.fasta.screen.ace

AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTTTCTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGGAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAA

>127.fasta.screen.ace

AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAA

>130.fasta.screen.ace

GTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCCAAGCTTGCTTGGTGGATCAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTGGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGT
CTAATACTGGATATGAGCCCTCATCGCATGGTGGGGTTGAAAAGATTTTTTGGTCTGGG
ATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGT
AGCCGGCCTGAGA

>132

agGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGgccccaa

>140.fasta.screen.ace

ATGCCTTACACATGCAACGaTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAA
AGATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGC
TATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACG
ATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGTGACTGAGACACGGCTACATga
ctccct

>149.fasta.screen.ace

AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAA

>153.fasta.screen.ace

ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
TAGGAGCGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAG

>154.fasta.screen.ace

GCTACACACGTGCTACAAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGATCACGCACAGTGTGAGCTAA
TCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGACACTCGAGTGCATGAAGTTGGAAT

CGTTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACACACCG
 CCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT

>155.fasta.screen.ace
 GGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCTCGCGAGTGTGA
 GCTAATCTCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGT
 GGAATCGCTAATAATCGCGGATCATCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTGACCCGAAGGTAGTGCGCTAAC

>156.fasta.screen.ace
 AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
 GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
 TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCCAA

>157.fasta.screen.ace
 ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
 GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
 ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
 TAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
 CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA

>159_10596_y2.abi
 gtacacaaacttagaggctggcagccgtcgcttccctgagcaaatgatcatcctctcagagc
 agctatggatcgctgccttggtagcctttaaccaccaactagctaatccaacgcgggc
 tcatcctctagcgataaatctttgtaccggaggacacatacggtattagcacaagtttcc
 ctgcggtattccgaagttaagggttagattccacgcgttactcaccgcgtgtgccgctaac
 gttggggggcgctcgagaagcatgtgtgaaacctgtcgccagcggttgttttgagacaca
 aaaaaaaccactccccacaccacaccacaatctcaaccaccaggaacatcaacaatc
 ctatccactcactatcacacaaaccaataaacaccctactcccccaaatattcttaacac
 tacaactaataacatacctccccaaaaaaccctataataaacaactatactct
 attaacacaaaaccactcaaccacaccaaacaacaacacctaccaataacaactaa
 caaacacacaacatccctccatacccaaccaaccccccccaacaacacatcaatgccc
 accaacacctacatcagattcaataccccacataacatccaactaacctttaataaaat
 cacacaccacacataccaatcgaataaaagcactaccacacatccatcacacatgacca
 tataagcaatcacaatcctgaccaccc

>160.fasta.screen.ace
 AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
 GTGGGAATCTACCTTTTACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
 TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTAAAGGATGAGCCCGGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCCAA

>161.fasta.screen.ace
 ATGCCTTACACATGCAAGTCGGACGGCAGCGCGGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAATACATCGGAACGTATCCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGAT
 TAATACCGCATACGCTCTGAGGAGGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCCTCGCGCTCAAGGGG
 CGTCCGATGGCGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCGACGATCCGTAG
 CTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA

>164.fasta.screen.ace
 AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
 GTGGGAATCTACCTTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG
 TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGGCTTGGATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCCAA

>167_9896_y2.abi
 ggtagctcgctctaacagtagtaaatattagttagaacaatcaccactaaagaaaccaca
 catccccacaaaccactggggcggggcttagacaaacccttgagtgccgtgtctcagt

ccaatgtagctgatcatcctctcacaacagctatggatcgtcgacttggttaggcctttaa
cccaccaactagctaataccaacgcgggctcatctcttgccgataaatctttctcccgaag
gacacatacgggtattagcacaagtttccctgcgttattccgtagcaaaaggtagattccc
acgcgttactcaccgctctgccgatcccccttgccggggcgctcgacttgcatgtgtaagc
ctgccgccagcgttctgttctgagccaaacactatccacaagcagcaggagcactgcctcc
atccccgtacacatatataacacactgtccagccattccacccacgctaaaccttcaagc
ggcatctgcactccactaactcaacatccaaactcattccagctcacgcccgtataaatc
gagaccacaatctacttcggagaccgatacgccctctcaacctcaaaacatgtcaactcc
caatccactacaccagagtctccccacaatctacactatggttttctaacagataggtac
aatgtgctctcacactaccaacatcatccaacgtactaaataacctcgtcaactcattgc
ccccatccagctaccaacacgaagccaccgcctacatcaacttcaaacgatcatctctcc
acactactcacatcaactacacgagcggacaccacactatcagtaaacacctacgtctcat
cgacaagacagctcagcacactcactcacgtcacccatgaagaaataccaatatcaa
atcactcgacacactcacgtaaatcctc

>170.fasta.screen.ace

GGGACCGGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA
GGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT
TACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGT
GTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCGCA
AGGAGGCAGCTAACACGGTAGGGTCAGC

>172.fasta.screen.ace

TGACCTCATTTGTGGATAATATCCCAGTGGTGTCTCCCGTACGAAAGAATAAGCACCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGCTGTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGG
AACTGCATTGGTGACTGCAGCGCTGGAGTATGGCAGAGGGGGGTGGAATTCACGTGTAG
CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAAT
ACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCAC
GCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCG
TGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCACCGGAATTGAAGGGGA
CCCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTAC
CCTTGACATGTACGGAACCTTGCCGAGAGGTGGGGGTGCCGAAAAGGGAGCCGTAAACACA
GGTGTGTCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCCTTGTCCCCAGTTGTACGCAAGAGCACTCCGGGGAGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGT
CATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAACC
GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGC
AGGATTTCAT

>173.fasta.screen.ace

CATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAG
TGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAA
GATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCT
ATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGA
TCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

>176.fasta.screen.ace

ACGGCAAACGGGCTGGGCTACCAACGTGACACCATGGTGGTGACAGTGGGCACCCGAGCA
CGCGAGTGTGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAG
TGCATGAACTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCACCATGCCCGGTGAATACGTTCCCG
GGACTTGTACACACCGCCCGTCA

>180.fasta.screen.ace

ATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGATCTAGCTTGCTAGATTGATGGCGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAG
ATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTA
TAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

>189_10378_y2.abi
gtggttntactggaactgtcgcggtgtctcagtoccaatgtggctgatcatcctctcagaa
cagctattgatcgctcgcccttggtgggcctttaccccaccaactagctaattccgacgtcgg
ctgatcctatagcgagaagtcttctgctgccaccgatacataccgcatgtcgtctggtgta
tcagcgtaacttccgactcaaggggtccacactaaagggttaagtcacgaggttttagttac
cgtgcgggggtctcgtattgtatgtgtaaaatacagtcgtgctggcggttcgcatggag
cctagtgtaaaggnccatgcccgcagccgtttcgtttctggagcacaaaacaannnccc
ccccccccctcatcacatccacaacataattacatcacacatacaccacacattctcaa
acactaccacacctcatagccagaccaatcgccgactccccctcacccaaccaagccaac
tgcacgtcgtccctataatctggactcgttatctcatcctcacacatgcatccccctcgta
tccagctccacacctctatctcccgacctcctccgcccattactagtcataacatactca
accgctaattcagcctctcctaccactctaactacctcgatccaccctatcaaaacacaca
gctaccaacaaccccataaaaaaaaaanaccnngagaccccccccttccccctcccccaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagttgaggggtcggggcgcccggtccctccctcaa
aaaaanaagaaaaatctaaaaaaaaggcccccgctcctcctcttttctgtt

>194.fasta.screen.ace
atgccttatgcatcagaacgaacCCCTGTGACATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAC
GCTTCGGCCATAGTGGCACACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCACGTTTCGGAA
TAACACCGAGACATTACTGCTCATAACCGGATGATATCCCGAGATCAAAGATTATCGCCT
GAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCGCACCAAGCGCAGCAT
CCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGACACTCTGGGACTGATACGCGGCGCAG

>195.fasta.screen.ace
CAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACG
CGTGGGAACATAACCTTTCTCGGAATAGCTCCGGGAACTGGAATTAATACCGCATAAC
GCCCTACGGGGGAAAGATTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCCAA

>199.fasta.screen.ace
TTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAATCTACCTTTTGTCTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTT
TCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGT
AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAG

>200.fasta.screen.ace
CTGAACCAAGCTTCACACATGCAAGTCGAGCGGCTGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTA
ACGCGTGGGAATCTACCTTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTA
TGTGTCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGG

>204_10719_y2.abi
acgctggactgtagctcgggtctcagtoccaactgtggctgatcgctcctctcagaccagcta
ctgatcgtcgcccttggtgggcctttaccccaccaactagctaattcagacatcgcccgctc
ctatagcatgaggccttgcggtccccactttcaccctcaggtcgtatgcggtattagct
aatctttcgactagttatccccactacagggcacgttccgatgtattactcaccggttc
gccactcgccatcaatctagcaagctagatcatgctgcccgttcgacttgcatgtgtaagg
catgcccgcagcggttcgttctgagccaataatcctacactacactcaccgcccacctcat
tctcaaatactatcctccacacccacccaaaaacacccaccccaacctacaaaaacaactca
tccccacctaacatatcacaatcccgcacactctcattttacaccatacacgtctccttcc
cacgccccatattgtcttagcgacccgcacttcaccaataagacctctccatgtctcta
ttctcacgcaaacaccacaactccccccgcatcaggactgaacgtcaccgatttcat
atcatacccaactcaacactatcatactgcaacctctcccatcaccacactcacactccc
ctctccttgccaccattagaggtatctctgactattccagtgacactcccactgaaattc
cgaccacaactctgcaaacagccccattacacgcacaacctcctactc

>206.fasta.screen.ace
AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAACGGCGGA
CGGGTGAATAAAGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAACCGGACGC
TGATACCGCATACGTATACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGAT

GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACTATCCCTTA
CTGGTCTGAAAAGATGATCAATCCCACCTGGAAGTGAAGACACGGGCCAG

>213.fasta.screen.ace

TTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAATCTACCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCT
TCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCAA

APÊNDICE C – Arquivo .phd gerado pelo programa PHRED.

O arquivo foi quebrado (não é mostrado a sequência completa) para representação em uma única página.

BEGIN_COMMENT

CHROMAT_FILE: 10581_153_y2.abi
ABI_THUMBPRINT: 077075307204000103100201061213
PHRED_VERSION: 0.000925.c
CALL_METHOD: phred
QUALITY_LEVELS: 99
TIME: Mon Oct 10 16:25:58 2005
TRACE_ARRAY_MIN_INDEX: 0
TRACE_ARRAY_MAX_INDEX: 8936
TRIM: 20 317 0.0500
CHEM: unknown
DYE: unknown

END_COMMENT

BEGIN_DNA

c 8 7
c 8 19
g 4 33
t 4 42
t 4 53
g 4 64
c 12 72
c 8 84
g 15 95
t 7 110
g 7 115
t 12 132

. . . .

c 6 8845
c 9 8855
c 11 8865
c 12 8879
c 15 8890
c 15 8902
c 15 8919
c 12 8929

END_DNA

END_SEQUENCE